

LOKALE UND SYSTEMISCHE IMMUNANTWORT
IM MAUSMODELL NACH AEROGENER APPLIKATION
VON STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B.
REGULATION UND PROTEKTIVE FUNKTION.

KARLHEINZ FRIEDRICH

Disbui. München
1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT FÜR HYGIENE UND TECHNOLOGIE
DER LEBENSMITTEL TIERISCHEN URSPRUNGS
(LEHRSTUHL: PROF. DR. G. TERPLAN)
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

LOKALE UND SYSTEMISCHE IMMUNANTWORT IM MAUSMODELL NACH
AEROGENER APPLIKATION VON STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B.
REGULATION UND PROTEKTIVE FUNKTION.

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VON
KARLHEINZ FRIEDRICH
AUS
LAUINGEN/DONAU

MÜNCHEN 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
Abkürzungen	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Puffer und Lösungen	13
2.2 Reagenzien	14
2.3 Versuchstiere	15
2.4 Toxin bzw. detoxifiziertes Antigen	15
2.4.1 Nachweis der immunologischen Spezifität des detoxifizierten Antigens	16
2.5 Adjuvantien	17
2.5.1 Bordetella pertussis Vakzine	17
2.5.2 Bakteriellcs Lipopolysaccharid	17
2.6 Proteinbestimmung	17
2.7 Immunisierungen	18
2.7.1 Intranasal	18
2.7.2 Intraperitoneal	19
2.8 Antisera und Spülproben	19
2.8.1 Antisera	19
2.8.2 Bronchial- und Intestinalspülproben	20
2.9 Antikörperbestimmung	21
2.9.1 "Enzyme-linked immunosorbent assay"	21
2.9.2 Passive, kutane Anaphylaxie	22
2.10. Aerogene Intoxikation mit SEB	23
3. ERGEBNISSE	24
3.1 Einfluß der Carboxymethylierung von SEB auf die immunologische Spezifität	24

3.2	Systemische Immunantwort nach intranasaler Stimulierung mit SEB	24
3.2.1	Isotypische Verteilung der anti-SEB Aktivität	24
3.2.2	Zeitkinetik der Isotyp-spezifischen anti-SEB Antwort	27
3.3	Systemische IgE anti-SEB Antwort	28
3.4	Lokale anti-SEB Antwort	31
3.5	Immunantwort nach aerogener Stimulierung mit cSEB	34
3.6	Einfluß eines intranasalen Primärstimulus auf die parenteral-induzierte Immunantwort	39
3.7	Einfluß eines parenteralen Primärstimulus auf die intranasal-induzierte Immunantwort	43
3.8	Einfluß von LPS auf die intranasal-induzierte anti-SEB Antwort	48
3.9	Einfluß einer aerogenen Vorbehandlung mit LPS auf die intranasal-induzierte anti-SEB Antwort	53
3.10	Aerogene Intoxikation mit SEB	56
3.11	Einfluß von LPS auf die aerogen-induzierte Immunantwort im C3H/HeJ Mausmodell	57
3.12	Einfluß der intranasal-induzierten Immunantwort auf die aerogene Intoxikation im C3H/HeJ Mausmodell	59
4.	DISKUSSION	61
5.	Zusammenfassung	72
	Summary	74
6.	LITERATURVERZEICHNIS	76

1. EINLEITUNG

Staphylokokken-Intoxikationen, hervorgerufen durch Staphylokokken-Enterotoxine ($SE_{(s)}$), zählen neben den Salmonellosen zu den häufigsten bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen. SE_s führen bei Mensch und Primaten 1-6 Stunden nach oraler Aufnahme zu den klassischen Symptomen einer Lebensmittelvergiftung, d.h. Erbrechen, Diarrhoe, verbunden mit Übelkeit, Schwindelgefühl, Speichelfluß, abdominalen Krämpfen, Schweißausbrüchen, Kopfschmerzen und Muskelkrämpfen. In schweren Fällen kann es zu Hypotonie, Fieber, Leukozytose und schließlich zum Schocksyndrom mit letalem Ausgang kommen. Laboratoriumstiere hingegen zeigen nach peroraler Applikation keine klinischen Erscheinungen. (6)

Nach langjährigen, jedoch erfolglosen Bemühungen (21), ist es nunmehr gelungen, die Pathogenese Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)-induzierter Intoxikationen in nicht sensibilisierten Affen wenigstens in Teilaspekten abzuklären. So konnte gezeigt werden, daß SEB neben den klassischen Symptomen einer intestinalen Intoxikation nach intradermaler Applikation auch Hautreaktionen vom Soforttyp auslösen kann (62). Hierdurch eröffneten sich ganz neue Möglichkeiten, die Pathophysiologie SEB-induzierter Reaktionen zu definieren. Daß die Mastzelle im zellulären und subzellulären Geschehen eine zentrale Rolle spielt, ist unbestritten. Nicht beantwortet ist jedoch die Frage, ob es sich hierbei um die **primäre** Zielzelle handelt, oder ob gegebenenfalls andere zelluläre Mechanismen vorgeschaltet sind. SEB induziert über spezifische Rezeptoren in der Zielzellmembran (4) die Freisetzung von Mediatoren, wobei Lipoxxygenaseprodukte des Arachidonsäurestoffwechsels wie Cysteinyl-Leukotriene eine wichtige pathophysiologische Rolle spielen. (63)

SE_s , die von einigen Staphylococcus aureus-Stämmen unter bestimmten Voraussetzungen in Lebensmitteln und Kulturmedien gebildet werden, sind wasserlösliche Exoproteine mit einer

Molekularmasse zwischen 26 und 30 kDa (7). Bisher gelang der Nachweis von 7 Serotypen (A, B, C₁, C₂, C₃, D und E), die durch ihre unterschiedliche immunologische Spezifität definiert sind (8). In der isoelektrischen Fokussierung zeigt gereinigtes SEB Mikroheterogenität, wobei die drei Komponenten pI-Werte zwischen 8.25 und 8.6 aufweisen (22). Alle bisher vollständig sequenzierten Serotypen, SEB (36) und SEC₁ (64), bestehen aus einer Peptidkette mit 239 Aminosäuren und bilden über eine Disulfidbrücke eine Aminosäureschleife ("cystine loop"). Ein direkter Vergleich der Sequenz von Aminosäureresten von SEA, SEB und SEC₁ zeigt, daß die "cystine loops" hinsichtlich Größe und Aminosäurezusammensetzung variieren, was dagegen spricht, daß die für die Toxizität verantwortlichen Strukturen "loop"-assoziiert sind (37). Ein Vergleich der Sequenzen von SEB und SEC₁ zeigt, neben weitgehenden Homologien im C-terminalen Bereich, Identität in 38 von 57 Aminosäureresten im N-terminalen Peptid (64). Diese Homologien bilden ganz zweifellos die strukturelle Basis für die mit heterologen Antisera nachweisbare Kreuzreaktion zwischen SEB und SEC₁ (72).

Neben ihrer toxischen Funktion verfügen SEA, SEB und SEC₁ in hohem Maß über mitogene Eigenschaften. Insbesondere an tryptischen Spaltprodukten des SEC₁ konnte gezeigt werden, daß Toxizität und Mitogenität mit voneinander unabhängigen Strukturen assoziiert sind (71). Während das N-terminale Fragment von SEC₁ (M_r=6500) mitogene Eigenschaften aufweist, zeigt der C-terminale Anteil (M_r=22000) ausschließlich toxische und keine mitogene Funktion (71).

Durch chemische Modifikationen des SEB-Moleküls wurde versucht, die für Bindung an Zielzellen sowie die für die Toxizität verantwortlichen Strukturen aufzuklären. So zeigten frühere Versuche, daß Alkylierung von mehr als sechs Methioninresten mit Jodessigsäure (15) bzw. Acetylierung von Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid oder Succinylierung mit Bernstein säureanhydrid (17) zwar zur Verminderung bzw. zum Ver-

lust der Toxizität führen, jedoch mit Änderungen in der Konformation des Moleküls und konsequenterweise mit drastischen Einschränkungen der immunologischen Spezifität assoziiert sind.

Weitere Versuche, wie chemische Modifikation der Carboxylgruppen mit Glycinmethylester in Gegenwart von Carbodiimid (16), Acetylierung von Tyrosinresten mit Acetylimidazol (14) und Guanidinierung und Nitroguanidinierung von ϵ -Aminogruppen der Lysinreste (70), unterstreichen die Bedeutung der nativen Konformation des SEB-Moleküls für dessen Aktivität.

Neuerdings konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von SEA (74) oder SEB (62) mit Bromessigsäure zur Carboxymethylierung von Histidinresten im Toxinmolekül (cSEA bzw. cSEB) und damit zur vollständigen Detoxifizierung führt, ohne die immunologische Spezifität einzuschränken. Carboxymethylierung modifiziert das ursprünglich basische SEB-Molekül zu mehr negativ geladenen Komponenten bei gleichzeitiger Zunahme der Mikroheterogenität (62). cSEB ist zwar befähigt, die Bindung des nativen Toxins an Zielzellrezeptoren kompetitiv zu hemmen, ohne jedoch gleichzeitig Signalfunktionen auszulösen (62). Dies spricht dafür, daß die Positivladung zur Entfaltung toxischer Funktionen (17), nicht jedoch für die Bindung von SEB an die Zielzelle erforderlich ist.

Versuche, beim Menschen einen belastbaren Impfschutz gegen Staphylokokken-Intoxikationen aufzubauen, sind durch die hohe Toxizität nativer SE-Moleküle und mangels geeigneter Detoxifizierungsverfahren limitiert. Anfängliche Versuche, Menschen mit Kulturfiltraten aktiv zu immunisieren (19), wurden daher nicht weitergeführt. Aktive Immunisierungsversuche mit gereinigten, nativen bzw. detoxifizierten SE_s (Enterotoxinoide) wurden bisher fast ausschließlich für die Gewinnung diagnostischer Antisera und lediglich vereinzelt bei Affen im Rahmen von Belastungsversuchen durchgeführt (referiert bei 73). Experimentell konnte gezeigt werden, daß SEB mittels Formaldehyd (F-SEB) in Abhängigkeit von Konzentration, Inkubations-

zeit, Temperatur und pH-Wert im Prinzip detoxifiziert werden kann (5). Erfolgt die Formaldehydinaktivierung von SE im basischen Bereich, so werden Monomere und wenige Dimere gebildet, während nach Inkubation im pH-Bereich von 7.5 bis 5.0 bevorzugt Oligomere entstehen (85). F-SEA und F-SEC₁ (86) verlieren jedoch, unabhängig vom Vernetzungsgrad, nach Inkubation bei pH 5.0 60-70 %, bei pH 7.5 80-85 % und bei pH 9.0 nahezu 100 % der immunologischen Spezifität. Der Inaktivierungsprozeß impliziert u.a. die chemische Modifikation von ϵ -Aminogruppen des Lysins, wobei die den inter- und intramolekularen Vernetzungen zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen nicht näher bekannt sind (67).

Von zentraler Bedeutung für den Aufbau einer protektiven Immunantwort ist das Funktionieren der zellulären und subzellulären Mechanismen des Immunsystems, die der genetischen Steuerung unterliegen. Den Hauptanteil immunologisch kompetenter Zellen bilden Lymphozyten, die im Knochenmark und anderen blutbildenden Organen aus Stammzellen unter Beteiligung von Differenzierungsfaktoren entstehen. Funktionell können zwei Lymphozytenpopulationen unterschieden werden: a) im Thymus reifende T-Lymphozyten und b) Thymus-unabhängige B-Lymphozyten. (60)

Die humorale Immunantwort wird durch funktionelle Kooperation von T- und B-Lymphozyten vermittelt, wobei Antigen-spezifische Membranrezeptoren der Vermittlung von Aktivierungssignalen dienen. Durch das Zusammenwirken von Antigen und T-Zell-vermittelten Signalen werden ruhende B-Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung in Plasmazellen angeregt. Plasmazellen sezernieren schließlich Immunglobuline (Ig), d.h. Antikörper, deren "binding-site" über Antigen-spezifische Strukturen verfügt, die denen zellulärer Rezeptoren analog sind. Ein Ig-Molekül setzt sich aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten zusammen, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Die vollständige Information für die Antikörpersynthese ist genetisch festgelegt, wobei die konstante Region

nur von einzelnen Genen kodiert wird. Die mit hoher Frequenz auftretende Diversität von Ig hingegen wird durch eine Vielzahl von Gensegmenten kodiert, die in vielfältiger Weise kombinierbar sind. Im Prinzip besteht darüberhinaus die Möglichkeit, daß die Diversität von Ig durch somatische Mutation noch erhöht wird. (60)

Daneben fungieren T-Lymphozyten als Träger der zellvermittelten Immunantwort, wobei sich funktionell drei verschiedene T-Zell-Subpopulationen unterteilen lassen: a) T Helfer (T_H)-Zellen, b) zytotoxische T-Lymphozyten (T_C) und c) T Suppressor (T_S)-Zellen. Da T_H -Zellen unmittelbaren Einfluß auf Effektorzellen ausüben, haben sie im Rahmen der humoralen sowie der zellvermittelten Immunantwort regulatorische Funktion. (60)

Neben den B- und T-Lymphozyten sind Monozyten und Makrophagen ($M\phi$) für das Funktionieren einer Immunantwort essentiell. Sie dienen nicht nur der Antigenerkennung und -metabolisierung, sondern sind für Lymphozytenproliferation und -differenzierung von zentraler Bedeutung (82). $M\phi$ exprimieren auf ihrer Zelloberfläche, neben Antigenstrukturen, Immunantwort-assoziierte Genprodukte (Ia; Klasse II Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes), deren Kooperation einmal die Antigenerkennung und konsequenterweise die Aktivierung von T_H -Zellen ermöglicht.

Die subtile Regulation der Immunantwort durch die am Immunsystem beteiligten Zellen erfolgt letztlich auf molekularer Basis durch Freisetzung von Mediatoren. So sezernieren $M\phi$ nach Antigenkontakt Interleukin 1, was zur Stimulierung von T_H -Zellen führt (60). Von besonderer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort sind Helfer(Potenzierungs)- bzw. Suppressorfaktoren, die Antigen- und Isotyp-spezifisch aus T_H - bzw. T_S -Zellen freigesetzt werden und im IgE-System besonders gut untersucht sind (38). T_H -Zellen wiederum setzen weitere Mediatoren wie Interleukin 2 und B-Zell-Wachstums- und Reifungsfaktoren frei, die einmal definierte T-Zell-Subpopulationen expandieren und zum anderen ruhende B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung stimulieren (60).



Gegen das Eindringen von pathogenen bzw. toxischen Makromolekülen im Bereich der Mucosa ist der Organismus zunächst durch die Mucusschicht und die epitheliale Barriere selbst geschützt. Die zelluläre Basis für das lokale Immunsystem bildet das sog. Mucosa-assoziierte, lymphatische Gewebe (Mucosa-associated lymphoid tissue; MALT). Die spezifische Antwort im Mucosa-assoziierten Immunsystem wird durch IgA repräsentiert, die prädominierende Antikörperpopulation in Sekreten (79). Sekretorisches IgA (sIgA) wird als dimeres Molekül in Plasmazellen gebildet und komplexiert anschließend mit der sog. sekretorischen Komponente (SC), die in der Zellmembran von Epithelzellen lokalisiert ist und von diesen synthetisiert wird (11). Der Transport von sIgA erfolgt in Vesikeln transepithelial und dessen Sekretion schließlich im apikalen Bereich der Epithelzellmembran in das Intestinal- bzw. Bronchiallumen (1). Das Vorkommen spezieller Antikörpermoleküle in den Sekreten erklärt einmal mehr, warum der Aufbau einer lokalen Resistenz bei gleichzeitiger Abwesenheit einer systemischen Immunantwort im Prinzip möglich ist. sIgA verfügt über ein selektives Transportsystem, wobei lokal synthetisierte Moleküle via Blut- und Lymphweg in die Zirkulation gelangen, und auf hepatobiliärem Weg schließlich in das Intestinum sezerniert werden (25). sIgA ist, wo immer es im Mucosa-Bereich synthetisiert wird, integrierender Bestandteil eines Abwehrsystems, wobei pathogene Makromoleküle komplexiert und via Leber-Galle rasch eliminiert werden. Insbesondere bei selektiven IgA-Immundefekten kommt es vermehrt zu einer lokalen Produktion von IgM, wobei das Molekül nicht kovalent an SC bindet, jedoch via Mucosa-Epithel analog dem sIgA sezerniert wird (10). IgE hingegen, definiert als allergischer Antikörper, ist bevorzugt in der Mucosa von Auge, Nase, Bronchien und Intestinum nachweisbar, verfügt aber nicht über das für sIgA und IgM charakteristische Transportsystem (50).

Neben dem systemischen Immunsystem verfügt der Organismus in Gestalt des lokalen, Mucosa-assoziierten Immunapparates im Bronchial- und Gastro-Intestinaltrakt über eine lokale Abwehrbarriere. Vergleichende Untersuchungen am Darm-(Gut-associated lymphoid tissue; GALT) und Bronchus-assoziierten, lymphatischen Gewebe (Bronchus-associated lymphoid tissue; BALT) haben gezeigt, daß beide Systeme mit einem Lympho-Epithel ausgestattet sind, das hinsichtlich der Antigenerkennung selektive Eigenschaften besitzt. So bestehen experimentelle Beweise dafür, daß eine antigene Stimulierung via GALT oder BALT einmal lokal und zum anderen aber auch in entfernt liegenden Mucosa-Bereichen zu einer spezifischen Immunantwort führt (51). Grundlage hierfür bildet eine broncho-intestinale Achse, die Teil eines gemeinsamen, Mucosa-assoziierten Immunsystems ist (9). Das zelluläre Substrat besteht überwiegend aus IgA-B-Vorläuferzellen, die nach lokaler Stimulierung partiell in Milz und Lymphknoten abwandern und dort zu IgA-produzierenden Plasmazellen differenzieren (40). Bevorzugt jedoch kehren diese Zellen in GALT bzw. BALT zurück, um sich hier zu IgA-Effektorzellen zu entwickeln (61). IgA-B-Vorläuferzellen exprimieren IgA auf der Zellmembran, und die IgA-produzierende Zelle reagiert bevorzugt mit Determinanten bakterieller Oberflächen (28). Von Popliteallymphknoten abstammende B-Vorläuferzellen hingegen exprimieren bevorzugt IgG in der Zellmembran und wandern primär in die Milz. Dabei siedeln von Mesenteriallymphknoten stammende B-Vorläuferzellen bevorzugt im GALT, während die aus Bronchiallymphknoten ausgeschleusten nahezu selektiv in die Lunge abwandern. Über die Ursachen dieses Wanderungsverhaltens sowie die Faktoren, die die Proliferation der abgesiedelten Zellen steuern, ist noch wenig bekannt (45). Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß T_H -Zellen in den Peyer'schen Platten IgA Isotyp-spezifisch und für die Absiedlung von IgA-B-Vorläuferzellen in MALT sowie für deren Stimulierung erforderlich sind (20). Unbestritten ist jedoch, daß die Lokalisation von IgA-B-Vorläuferzellen im MALT durch Hormone beeinflusst wird (46).

Ein gutes Beispiel für die subtile und selektive Regulation der Immunantwort im GALT ist die orale Toleranz. So führt die mehrmalige, orale Stimulierung in Abhängigkeit von Struktur und Applikationsfrequenz des Antigens zur lokalen Immunantwort und gleichzeitig zu systemischer Toleranz (12). Die Analyse der regulatorischen T-Zellen in den Peyer'schen Platten und der Milz oral immunisierter Mäuse zeigt, daß systemische Toleranz mit einer Prädominanz von T_S -Zellen assoziiert ist. Die Suppressoraktivität setzt in der Frühphase der Immunantwort ein, wobei im GALT gebildete T_S -Vorläuferzellen zu T_S -Effektorzellen differenzieren. Eine im weiteren Verlauf erfolgende Absiedlung der T_S -Zellen vom Ort der Stimulierung in das periphere, lymphatische Gewebe führt anschließend zu einer verminderten, systemischen Immunantwort, die für den IgM- und IgG-Isotyp spezifisch ist (43). Inzwischen gibt es überzeugende Beweise dafür, daß die Mucosa-assoziierte Immunantwort Isotyp-spezifisch durch T_H - und T_S -Zellen reguliert wird, wobei in oral immunisierten Mäusen gleichzeitig im IgG- und IgE-System die T_S -Zellen (55), im IgA-System hingegen T_H -Zellen dominieren (59). Die Tatsache, daß in oral immunisierten Mäusen vermehrt IgE-spezifische T_S -Zellen in den Peyer'schen Platten auftreten, bietet Ansätze zur Therapie allergischer Erkrankungen. Mehrmalige, aerogene Immunisierung führt in Abhängigkeit von der Applikationsfrequenz in zunehmendem Maße zu einer Steigerung der systemischen IgG-Antwort. Gleichzeitig jedoch proliferieren IgE-spezifische T_S -Zellen, die nach parenteraler Restimulierung Antigen- und Isotyp-spezifische Toleranz hervorrufen (65).

Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß die oral-induzierte, systemische Toleranz einer genetischen Kontrolle unterliegt. So sind z.B. isogenetische C3H/HeJ Mäuse, deren Lympho- und Monozyten funktionell areaktiv gegenüber bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid; LPS) sind, nicht dazu befähigt, systemische Toleranz zu entwickeln (84). Es gibt Hinweise dafür, daß im GALT T_S -Vorläuferzellen durch LPS akti-

viert werden. Wiederholte Antigenexposition führt schließlich zur Proliferation und Differenzierung in T_S -Effektorzellen, die in peripheres, lymphatisches Gewebe abwandern und systemische Toleranz vermitteln (84).

Weiterhin kommt es nach mehrfacher, aerogener Immunisierung von Kaninchen mit SEB via Aerosol (42) bzw. intranasaler Applikation (nicht veröffentlicht) zu vollständiger oder mindestens partieller Toleranz. Da bei aerogener Applikation das Antigen durch direktes Abschlucken, Abhusten und Zilienbewegungen des Schleimhautepithels größtenteils in den Magen-Darmtrakt gelangt (35), ist nicht auszuschließen, daß auch unter diesen Bedingungen die Toleranz auf oralem Weg induziert wird. So werden nach aerogener Immunisierung mit radioaktiv-markiertem Eialbumin mittels Aerosol lediglich 13 % und via intranasaler Applikation 15 bis 60 % im Respirationstrakt wiedergefunden, während die Hauptmenge des verabreichten Antigens im Magen-Darmtrakt nachweisbar ist (35). Untersuchungen zur Kinetik der Mucosa-assoziierten Immunantwort in der Maus haben einmal gezeigt, daß die intranasale Restimulation nach aerogenem Primärstimulus zu einer klassischen "Booster"-Reaktion im oberen Respirationstrakt führt (29). Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß durch perorale Restimulation nach parenteralem Primärstimulus in der Ratte eine effiziente, Mucosa-assoziierte IgA-Antwort etabliert werden kann (57).

Relevant für die via MALT-induzierte Immunreaktion ist die Beobachtung, daß durch Kombination von Antigen und Adjuvantien die Immunantwort gesteigert wird. So führt die Applikation von Bordetella pertussis Vakzine (BpV) bevorzugt zu einer Potenzierung der IgE-Synthese (76). Von Interesse ist auch, daß Immunisierungen via BALT in Gegenwart von BpV die IgE-Antwort drastisch zu steigern vermögen (30).

LPS, Bestandteil der Zelloberfläche gramnegativer Bakterien, besteht aus einer Lipoid(Lipoid A)- und einer Heteropolysaccharidkomponente, die wiederum in den O-Polysaccharidanteil

und den Core-Polysaccharid untergliedert werden kann. Diese komplette LPS-Struktur wird von der S(smooth)-Form gramnegativer Bakterien synthetisiert. R(rough)-Mutanten hingegen bilden inkomplettes LPS, bestehend aus Lipoid A und verschiedenen großen Core-Polysaccharidanteilen. Während O-Polysaccharide die serologische Spezifität (O-Antigene) von LPS und dem ursprünglichen Bakterienstamm tragen, sind Toxizität und andere biologische Eigenschaften mit Lipoid A assoziiert (27). LPS ist ein potentes B-Zell-Mitogen (2) und zeigt zudem Adjuvanseigenschaften (13). Von besonderer Bedeutung ist hierbei das Zeitintervall zwischen Adjuvans- und Antigenexposition. Zum einen gelingt es, mit Lipoid A (24) bzw. mit von *Salmonella*-Mutanten (R-Form) stammenden Glykolipiden (53), bestehend aus Lipoid A und 2-Keto-deoxyoctonat (KDO), bei simultaner Antigenapplikation die Antikörperantwort zu steigern. Zum anderen wird gezeigt, daß die Applikation von Lipoid A zwei bis drei Tage vor dem Antigenstimulus eine Suppression der systemischen Immunantwort vermittelt (54).

Experimentell ließ sich zeigen, daß die Immunisierung von Affen mit F-SEB unabhängig vom Applikationsmodus zu einer im Vergleich zum nativen Toxin schwächeren Immunantwort führt (68). Durch Adsorption von SEB an Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) gelang es jedoch, gegenüber einer 200fach emetischen Dosis zu schützen, obwohl nach subkutaner, insbesondere aber nach oraler Immunisierung SEB-spezifische Antikörper nicht konstant nachzuweisen waren. Andererseits zeigten einige Tiere trotz humoraler Antikörper klinische Symptome einer Staphylokokken-Intoxikation. (5) Im Prinzip wurde jedoch gezeigt, daß die intrakutane Immunisierung mit SEB bzw. F-SEB zur Bildung protektiver Antikörper führt, während die oral-induzierte, systemische Immunantwort nicht reproduzierbar Schutz verleiht (68). Darüberhinaus wurde gezeigt, daß humorale anti-SEB Antikörper wohl bei intravenöser, nicht jedoch bei peroraler Belastung mit dem homologen Toxin schützen (47). Konsequenterweise läßt sich aus diesen Befunden schließen, daß humora-

le anti-SEB Antikörper systemische, nicht jedoch lokale Resistenz vermitteln. Da Versuche zur protektiven Immunantwort via MALT bisher nicht durchgeführt wurden, ist nicht geklärt, ob und inwieweit der Aufbau einer Mucosa-assoziierten Immunantwort bei aerogener bzw. peroraler, d.h. nicht systemischer Toxinapplikation schützt.

Da der intestinalen Mucosa im Rahmen der SE-vermittelten Intoxikation eine wichtige Barrierefunktion zukommt, ist es das Ziel dieser Arbeit, am Mausmodell eine Mucosa-assoziierte Immunantwort zu etablieren und die Mechanismen ihrer Regulation zu untersuchen. In isogenetischen BALB/c- bzw. C3H-Mäusen wird die Mucosa-assoziierte (bronchial und intestinal) und die systemische Immunantwort nach intranasaler Stimulierung mit SEB vergleichend analysiert. Dabei ist im Hinblick auf die Existenz einer broncho-intestinalen Achse vor allem zu prüfen, ob eine aerogen-induzierte Immunantwort auch intestinal etabliert werden kann.

Dabei soll die Charakterisierung lokaler bzw. systemischer Antikörper durch Analyse der isotypischen Verteilung der Antikörperaktivität erfolgen. Weiterhin ist zu prüfen, welche Bedeutung bakterielles LPS bzw. Adjuvantien wie BpV für die Regulation der aerogen-induzierten Immunantwort besitzen. Schließlich soll an einem SEB-sensiblen Mausmodell untersucht werden, ob und inwieweit der aerogen-induzierten Immunantwort schützende Funktion zukommt.

ABKÜRZUNGEN

Anti-SEB	Anti-SEB Antikörper
BALT	"Bronchus-associated lymphoid tissue"; Bronchus-assoziiertes, lymphatisches Gewebe
BpV	Bordetella pertussis Vakzine
BSA	Bovines Serumalbumin
EA	Eialbumin
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"; Enzym-Immunistest
GALT	"Gut-associated lymphoid tissue"; Darm-assoziiertes, lymphatisches Gewebe
Ig	Immunglobulin
IN	Intranasal
IP	Intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid aus Salmonella minnesota R-595
MALT	"Mucosa-associated lymphoid tissue"; Mucosa-assoziiertes, lymphatisches Gewebe
OPD	Ortho-Phenylendiamin
PCA	Passive, kutane Anaphylaxie
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
cSEB	Carboxymethyliertes Staphylokokken-Enterotoxin B
SC	Sekretorische Komponente
sIgA	Sekretorisches IgA
T _{CS} -Zellen	T Contrasuppressor-Zellen
T _H -Zellen	T Helfer-Zellen
T _S -Zellen	T Suppressor-Zellen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer und Lösungen

HBSS: Gepufferte Salzlösung nach Hanks

140 mM NaCl

5.4 mM KCl

1.0 mM CaCl_2

0.41 mM MgSO_4

0.49 mM MgCl_2

0.44 mM KH_2PO_4

4.2 mM NaHCO_3

0.34 mM Na_2HPO_4

5.6 mM Glukose

50 mg Heparin

200 mg Natriumazid

auf 1000 ml Endvolumen

PBS-1: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

140 mM NaCl

8 mM Na_2HPO_4

3 mM KH_2PO_4

pH 7.2

PBS-2: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PBS-1, pH 7.2, substituiert mit

2 % bovinem Serumalbumin (BSA)

0.5 ml Tween 20

in 1000 ml Endvolumen

Phosphat-Citratpuffer:

100 mM Citronensäure (243 ml), mit

200 mM Na_2HPO_4 auf pH 5.0 einstellen und mit

Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

NaCl/Tween:

150 mM NaCl

0.5 ml Tween 20

in 1000 ml Endvolumen

2.2 Reagenzien

Aluminiumhydroxid (Alu-Gel-S)	Serva Heidelberg
Bordetella pertussis Vakzine	Behringwerke, Marburg
Bovines Serumalbumin (98-99 % Albumin, globulinfrei)	Sigma, D-8024 Deisenhofen
Eialbumin (Grade V)	Sigma, D-8024 Deisenhofen
Evans Blau	Sigma, D-8024 Deisenhofen
Heparin-Natrium (mind. 150000 IU/g)	Serva, Heidelberg
Myoglobin vom Pottwal	Serva, Heidelberg
Ortho-Phenylendiamin	Sigma, D-8024 Deisenhofen
Peroxidase-konjugierte Antisera (Ziege), monospezifisch für Maus IgM, IgG, IgA	Cappel Lab. Inc., Cochran- ville, Pa./USA
Peroxidase-konjugierte, affini- tätsgereinigte Antikörper, spe- zifisch für Kaninchen IgG, H- und L-Kette	Miles, Bayer Diagnostic, München
Phenylmethansulfonylfluorid	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, D-8024 Deisenhofen

2.3 Versuchstiere

Für die Versuche wurden nachfolgende, genetisch definierte Stämme verwendet:

Mäuse: BALB/c (H-2^d), C3H/f (H-2^k), C3H/HeJ (H-2^k),
C3H/HeN (H-2^k), C57BL/10ScCr (H-2^b).
Ratten: BS (RT-1^v).

Mit Ausnahme der Mäusestämme C3H/HeJ und C57BL/10ScCr, die käuflich von der Firma Bomholtgard, Dänemark erworben wurden, stammten sämtliche Versuchstiere ursprünglich aus den Zuchten des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie, Freiburg. Die weitere Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgte in der Versuchstieranlage der Chirurgischen Universitätsklinik Innenstadt, München unter standardisierten Milieubedingungen (20[±] 2°C, 55[±] 5 % relative Luftfeuchtigkeit) im offenen System. Die Tiere erhielten pelletiertes Fertigfutter (Alma, Kempten) und Wasser ad libitum.

Zu Beginn der Versuche waren Mäuse 8-10 Wochen und Ratten 4-9 Monate alt.

2.4 Toxin bzw. detoxifiziertes Antigen

Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) wurde am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München (Prof. Dr. G. Terplan) hergestellt und nach dem Verfahren von Ende et al. (22) gereinigt. Die Produktion von detoxifiziertem SEB durch Carboxymethylierung von Histidinresten nach dem von Harris und Hill (32) beschriebenen Verfahren erfolgte am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg (62). Die experimentellen Details dieser chemischen Modifikation werden nachfolgend nochmals kurz zusammengefaßt. SEB, 0.6 % in 0.5 M Ka-

liumphosphatpuffer, pH 7.0, wurde mit 0.4 M Bromessigsäure, eingestellt mit 5 N NaOH auf pH 7.0, im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und der Reaktionsansatz für 7 Tage bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß inkubiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung von modifiziertem SEB mittels Aminosäureanalyse, isoelektrischer Fokussierung sowie durch Prüfung auf biologische Aktivität (62).

2.4.1 Nachweis der immunologischen Spezifität des detoxifizierten Antigens

Der Nachweis der immunologischen Spezifität von cSEB erfolgte mittels Hemm-"enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Hierzu wurde Maus anti-SEB 1:60000 verdünnt, mit SEB bzw. cSEB in Endkonzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-13} M gemischt und der Reaktionsansatz 2 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 0.1 ml Portionen des Toxin/Antikörper-Gemisches in SEB-beschichtete Kavitäten von Mikrotiterplatten (Immulon, M 129 B; Dynatech, Denkendorf) (siehe Kapitel 2.9.1) pipettiert und 1 Std. bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit NaCl/Tween und anschließendem Trocknen der Mikrotiterplatten wurde anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (Cappel Lab. Inc., Cochranville, Pa./USA) zugegeben, erneut 1 Std. inkubiert und der Reaktionsansatz wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben komplettiert.

Der I_{50} -Wert ist definiert als die Toxinkonzentration (-log M), die erforderlich ist, um die Bindung von anti-SEB an Festphasen-SEB zu 50 % zu hemmen.

2.5 Adjuvantien

2.5.1 Bordetella pertussis Vakzine

Um die Frage zu beantworten, ob Bordetella pertussis Vakzine (BpV) eine aerogen-induzierte anti-SEB Antwort potenziert oder gegebenenfalls zur Allergisierung führt, wurden Mäuse verschiedener Inzuchtstämme simultan mit SEB und BpV (2.5×10^8 Keime/Maus) immunisiert.

Hierzu wurden SEB in der gewünschten Konzentration und BpV (Stammlösung 1×10^{10} Keime/ml) im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und in einem Endvolumen von 50 μ l Mäusen intranasal (IN) verabreicht (siehe Kapitel 2.7.1).

2.5.2 Bakteriellcs Lipopolysaccharid

Mit dem Ziel, den Einfluß von bakteriellcm Lipopolysaccharid (LPS) auf die aerogen-induzierte anti-SEB Antwort zu untersuchen, wurde LPS aus Salmonella minnesota R-595 (Dr. C. Galanos, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg), bestehend aus Lipoid A und 2-Keto-deoxyoctonat (KDO), verwendet.

LPS (Stammlösung 8 mg/ml) wurde mit PBS-1 zur gewünschten Konzentration verdünnt und Mäusen verschiedener Inzuchtstämme entweder simultan mit SEB oder 5 Tage vor dem Antigenstimulus IN appliziert (siehe Kapitel 2.7.1).

2.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von SEB-Lösungen erfolgte mittels Extinktionsmessung bei 277 nm, wobei ein Extinktionskoeffizient von $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 14.4$ (6) zugrunde gelegt wurde.

2.7 Immunisierungen

2.7.1 Intranasal

Mäuse in Gruppen von 6 Tieren (männlich und weiblich) wurden jeweils vor Versuchsbeginn retroorbital geblutet, gewonnene Sera (0-Sera) nach Gruppen vereinigt und mittels ELISA auf das Vorhandensein von anti-SEB Antikörpern untersucht (siehe Kapitel 2.9.1).

Im Grundversuch wurden BALB/c Mäuse mit Äther leicht narkotisiert und fünfmal im Abstand von 14 Tagen mit steigenden Dosen SEB bzw. cSEB (2-50 µg) in 25 µl PBS-1 mit bzw. ohne Zusatz von 25 µl BpV IN stimuliert.

In einigen Versuchsansätzen wurden BALB/c Mäuse lediglich ein-, zwei- bzw. dreimal IN in Gegenwart bzw. Abwesenheit von BpV immunisiert oder 14 Tage nach einem parenteralen Primärstimulus fünfmal in wöchentlichem Abstand mit 10 µg SEB in Gegenwart von BpV IN restimuliert.

Mit dem Ziel, den Einfluß von LPS auf die SEB-induzierte Immunantwort zu untersuchen, wurden BALB/c- bzw. LPS-areaktive C3H/HeJ-Mäuse fünf- bis sechsmal in wöchentlichen Abständen simultan mit SEB und steigenden Dosen LPS (1-100 µg) IN stimuliert. Alternativ hierzu wurden BALB/c Mäuse IN mit 10 µg LPS entweder 5 Tage vor oder simultan mit dem im 14-Tage-Intervall erfolgenden SEB-Stimulus immunisiert.

Kontrollgruppen erhielten entweder Eialbumin (EA) in PBS-1 mit bzw. ohne Adjuvanzzusatz bzw. Puffer oder LPS allein.

Zur Stimulierung wurden Stammlösungen von SEB (2.85 mg/ml bzw. 1.8 mg/ml), EA (2 mg/ml) und LPS (8 mg/ml) mit PBS-1 zur gewünschten Konzentration verdünnt, wobei die IN Applikation in einem Endvolumen von 50 µl durch Auftropfen auf beide Nasenlöcher mittels Eppendorf-Pipette erfolgte.

2.7.2 Intraperitoneal

Parenterale Immunisierungen mit SEB erfolgten entweder als Primärstimulus vor oder als Restimulierung nach vorhergehender IN Sensibilisierung. Zu diesem Zweck wurde 10 µg SEB in 0.1 ml PBS-1 durch Inkubation bei 4°C für 60 Min. an 2 mg Aluminiumhydroxid adsorbiert und in einem Endvolumen von 0.2 ml intraperitoneal (IP) injiziert.

Die Applikation erfolgte entweder als Primärstimulus 14 Tage vor IN Restimulierung oder zweimal 10 und 24 Tage nach einer Serie von IN Applikationen. In einigen wenigen Versuchsgruppen wurden Mäuse erst 16 und 18 Wochen nach mehrfacher IN Stimulierung zweimal IP restimuliert.

2.8 Antisera und Spülproben

2.8.1 Antisera

Mäuse wurden in der Regel 1 Tag vor jeder IN Restimulierung in Äthernarkose vom Retroorbitalplexus geblutet. Mit dem Ziel, den Einfluß des Zeitintervalls zwischen IN Applikation von LPS und SEB zu untersuchen, erfolgten die Blutentnahmen jeweils 7 Tage nach IN Applikation.

Bei IP Applikation wurden Mäuse 1 Tag vor und 14 Tage nach Stimulierung geblutet. Nach einer Serie von IN Immunisierungen erfolgten Blutentnahmen jeweils 7 Tage nach letzter IN Applikation sowie 4 und 10 Tage nach IP Restimulierung.

Abhängig von der Fragestellung wurden Mäuse zur Gewinnung größerer Blutmengen sowie von Bronchial- und Intestinalspülproben 10 oder 14 Tage nach letzter IN bzw. IP Applikation in Äthernarkose entblutet.

Blutproben wurden nach Gruppen vereinigt, unmittelbar nach der Entnahme 1 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert, über Nacht bei 4°C gehalten und schließlich zur Abtrennung der Antisera zweimal bei 1300 x G für 20 Min. (4°C) zentrifugiert. Die erhaltenen Antisera wurden bis zum Gebrauch bei -80°C konserviert.

Peroxidase-konjugierte Antisera (Ziege), monospezifisch für Maus IgM, IgG und IgA sowie Peroxidase-konjugierte, affinitätsgereinigte Antikörper, spezifisch für Kaninchen IgG, H- und L-Kette, waren Handelspräparate. Kaninchenantiserum, spezifisch für die sekretorische Komponente (SC) der Ratte (anti-SC, Präparatnummer L816) wurde uns freundlicherweise von Dr. Vaerman, Universität Louvain, Brüssel/Belgien zur Verfügung gestellt.

2.8.2 Bronchial- und Intestinalspülproben

Zur Gewinnung von Bronchialspülflüssigkeiten wurden Mäuse in Narkose entblutet. Anschließend wurde ein auf ca. 8 mm gekürzter Venenkatheder (Durchmesser 0.5 x 0.9 mm; Braun, Melsungen) in die Trachea eingeführt, mit Nahtmaterial fixiert und Trachea und Bronchien dreimal mit je 0.3 ml eiskalter HBSS gespült, wobei dem Puffer unmittelbar vor Gebrauch zur Hemmung des Abbaus von Proteinen 100 µM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) als Proteinaseinhibitor zugesetzt wurde (39).

Zur Gewinnung von Intestinalspülproben wurde der Dünndarm enteriert und das Darmlumen zweimal mit je 2 ml HBSS, substituiert mit 100 µM PMSF, gespült.

Die Spülproben wurden nach Gruppen vereinigt, zweimal bei 5000 x G für 20 Min. (4°C) zentrifugiert und bis zum Gebrauch bei -80°C konserviert.

2.9 Antikörperbestimmung

2.9.1 "Enzyme-linked immunosorbent assay"

In Vorversuchen wurde die optimale SEB-Konzentration zur Beschichtung von Mikrotiterplatten sowie die geeignete Verdünnung der Peroxidase-konjugierten Antikörper, spezifisch für Maus Ig Isotypen, bestimmt. Die Beschichtung mit SEB (1.4 µg/ml) erfolgte nach der Methode von Engvall und Perlmann (23), wobei das Verfahren wie folgt modifiziert wurde: Eine Stammlösung von SEB (2.85 mg/ml) wurde in PBS-1 ohne Zugabe eines Konservierungsstoffes passend verdünnt, die Kavitäten von Mikrotiterplatten mit 100 µl SEB-Lösung beschickt und anschließend 3 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Mikrotiterplatten wurden für weitere 20 Std. bei 4°C gehalten, danach mit einem 12-Kanal-Waschgerät (Immunowash; Nunc, Wiesbaden) fünfmal mit NaCl/Tween gewaschen und getrocknet. Antisera sowie Präimmun- und Kontrollsera wurden im Verhältnis 1:30 in PBS-2 vorverdünnt, mittels 12-Kanal-Pipettierhandgriff (Dynatech, Denkendorf) in der Mikrotiterplatte jeweils im Dreifachansatz weiterverdünnt (100 µl/Kavität) und die Platten für 60 Min. bei Zimmertemperatur auf einem Taumelgerät (Reax 3, Heidolph) inkubiert. Von Bronchial- und Intestinalspülproben wurde zunächst mit PBS-2, substituiert mit 100 µM PMSF (34), eine 1:3 Stammverdünnung hergestellt und analog den Serumproben in Mikrotiterplatten weiterverdünnt. Nach fünfmaligem Waschen mit NaCl/Tween und anschließendem Trocknen wurden die Kavitäten mit 100 µl Antikörper-Peroxidase-Konjugaten, monospezifisch für Maus Ig Isotypen, beschickt und für weitere 60 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten erneut fünfmal mit NaCl/Tween gewaschen und getrocknet.

Zur Herstellung des Substrates wurden 40 mg ortho-Phenylendi-amin (OPD) in 100 ml Phosphat-Citratpuffer, pH 5.0, gelöst und kurz vor Gebrauch 40 μ l 30 % H_2O_2 zugesetzt. Das Substrat wurde in 100 μ l Portionen zugegeben, die Reaktion nach 15 Min. mit 1.25 M H_2SO_4 (25 μ l/Kavität) beendet und mit Hilfe eines Titertek Multiskan MCC/340 (Flow Lab., Meckenheim) die Absorption bei 492 nm gemessen.

Der ELISA-Titer ist definiert als dekadischer Logarithmus (log) der Antiserum- bzw. Spülprobenverdünnung, deren Extinktionswert 0.1 über dem Nullwert liegt (44).

Um monomeres von sekretorischem IgA (sIgA) zu unterscheiden und zu quantifizieren, war es erforderlich, die verfügbaren anti-IgA- bzw. anti-SC-Antisera mindestens in gleicher Konzentration und gegebenenfalls gleicher Affinität einzusetzen. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe von Ratten-sIgA (Dr. Vaerman, Universität Louvain, Brüssel/Belgien), ausgehend von 1 μ g/ml (100 μ l/ Kavität), in Mikrotiterplatten als Festphase aufgebaut und die Bindungskapazität von Peroxidase-konjugiertem anti-Maus IgA und anti-SC vergleichend untersucht. Auf der Basis der hierbei ermittelten Daten wurde im ELISA anti-IgA bei einer Standardverdünnung von 1:1000 und anti-SC bei einer solchen von 1:100 eingesetzt. Die Bindung von anti-SC an sIgA wurde durch Peroxidase-markiertes anti-Kaninchen IgG nachgewiesen.

2.9.2 Passive, kutane Anaphylaxie

Sera und Spülproben wurden in PBS-1, substituiert mit 0.03 % BSA, verdünnt und in 0.1 ml Portionen intradermal in die Rücken- haut von BS Ratten appliziert. Nach einer Latenzzeit von 72 Std. erhielten die Tiere 150 μ g SEB in 0.5 % Evans Blau in einem Endvolumen von 1 ml PBS-1 intravenös. 30 Min. später wurden die Tiere in Äthernarkose getötet und der Durchmesser der Hautreaktion auf der Hautinnenseite abgelesen.

Der Titer der passiven, kutanen Anaphylaxie (PCA) ist definiert als reziproke Serum- bzw. Spülprobenverdünnung, die eine Hautreaktion von mindestens 5 mm induziert.

Daß die PCA unter den gewählten Bedingungen selektiv durch Maus-Antikörper des IgE-Isotyps vermittelt wird, belegen nachfolgende Kriterien: a) selektive Bindungsfähigkeit von Maus IgE an Mastzellen in der Rattenhaut, b) Persistenz der Mastzell-sensibilisierenden Eigenschaften und c) Verlust der Bindung von Maus IgE an $Fc\epsilon$ -Rezeptoren in der Mastzellmembran durch Erhitzen auf 56°C. (87)

2.10 Aerogene Intoxikation mit SEB

In Vorversuchen wurden LPS-reaktive C3H/f-, C3H/HeN- bzw. LPS-areaktive C3H/HeJ- und C57BL/10ScCr-Mäuse einmal mit SEB im Dosisbereich von 2-50 µg IN belastet und anschließend die Überlebensrate über einen Zeitraum von 3-6 Tagen verfolgt.

Im Hauptversuch wurden C3H/HeJ Mäuse zweimal im Abstand von 14 Tagen entweder IN mit 1 µg SEB und BpV oder IP mit 1 µg SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, stimuliert und 14 Tage nach letzter Antigenexposition mit 10 bzw. 50 µg SEB IN belastet. Alternativ hierzu wurden C3H/HeJ- und C3H/f- Mäuse viermal IN in wöchentlichem Abstand mit 1 µg SEB mit und ohne BpV immunisiert und zwei bis drei Wochen nach letztem Antigenstimulus mit SEB belastet.

Kontrolltiere wurden aerogen mit 1 µg Myoglobin vom Pottwal in Kombination mit BpV immunisiert und analog den experimentellen Gruppen belastet.

Myoglobin vom Pottwal wurde als Kontrollantigen gewählt, weil sein isoelektrischer Punkt (pI 8.3) mit dem von SEB weitgehend übereinstimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Einfluß der Carboxymethylierung von SEB auf die immunologische Spezifität

Neuerdings konnte gezeigt werden, daß die Carboxymethylierung von SE Typ A (SEA) zum Verlust der Toxizität führt, ohne die immunologische Spezifität des Moleküls einzuschränken (74). Analog SEA war auch die Carboxymethylierung von SEB (cSEB) für Histidinreste spezifisch und führte zu deren vollständiger Derivatisierung (62). Nachdem bereits gezeigt wurde, daß cSEB atoxisch ist (62), war nunmehr zu prüfen, ob und inwieweit die Carboxymethylierung von SEB die immunologische Spezifität beeinflusst. Für vergleichende Untersuchungen diente der Hemm-ELISA als Testsystem, wobei SEB und cSEB auf ihre Fähigkeit analysiert wurden, die Reaktion zwischen anti-SEB und Festphasen-SEB zu hemmen. Vergleichende Analysen zur Spezifität von SEB und cSEB erfolgten auf der Basis molarer Inhibitorkonzentrationen, wobei 50% Hemmung als Richtwert diente.

Wie die in Abb.3 wiedergegebene Graphik zeigt, hemmen 10^{-10} M SEB bzw. 10^{-9} M cSEB die Bindung von anti-SEB an Festphasen-SEB zu 50 %. Dieser Befund spricht dafür, daß die immunologische Spezifität von SEB nach Carboxymethylierung lediglich geringgradig eingeschränkt wird.

3.2 Systemische Immunantwort nach intranasaler Stimulierung mit SEB.

3.2.1 Isotypische Verteilung der anti-SEB Aktivität

Zur Optimierung der aerogen-induzierten, lokalen und systemischen Immunantwort wurden BALB/c Mäuse zunächst mit steigenden SEB-Dosen (2-50 µg) mit und ohne BpV (2.5×10^8 Keime/Maus) nach dem in Abb. 2 wiedergegebenen Schema IN stimuliert und geblutet.

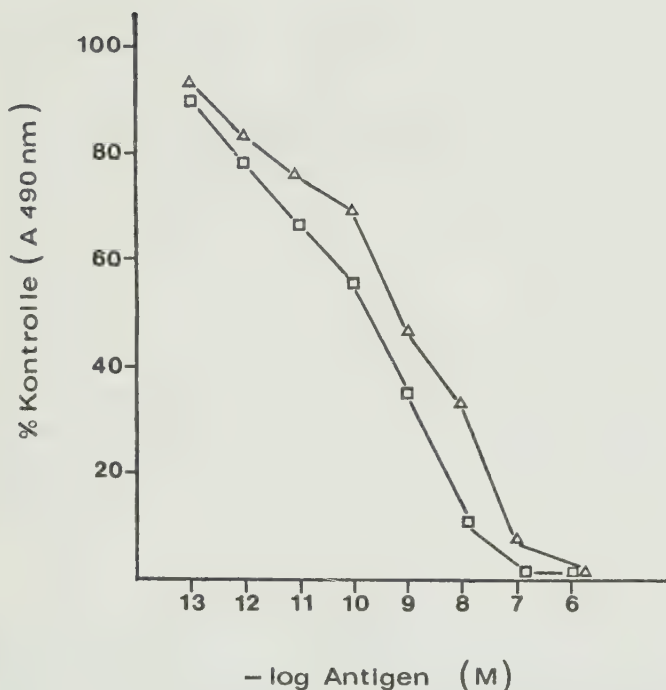


Abbildung 1. Hemmung der Bindung von anti-SEB an Festphasen-SEB durch lösliches SEB bzw. cSEB.

SEB (□) bzw. cSEB (Δ) wurden im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-13} M einer Standardverdünnung von anti-SEB (1:60000) zugesetzt und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 0.1 ml des Reaktionsansatzes in SEB-beschichtete Kavitäten (140 ng/Kavität) von Mikrotiterplatten pipettiert und 1 Std. inkubiert. Die Bindung von anti-SEB an Festphasen-SEB wurde durch Peroxidase-konjugiertes anti-Maus IgG nachgewiesen.

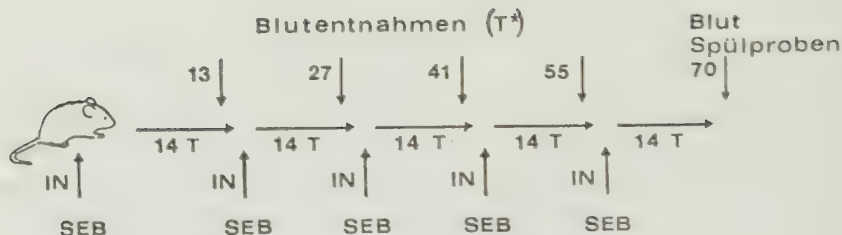


Abbildung 2. Schema für die intranasale Immunisierung von BALB/c Mäusen mit SEB.

* T; Tag.

Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Daten zeigen, daß nach der 4. IN Stimulierung mit 10 µg SEB eine systemische IgM-, IgG- und IgA-Immunantwort induziert wird, die durch weitere Erhöhung der SEB-Dosis auf 50 µg nicht signifikant gesteigert werden kann, während nach Applikation von 2 µg SEB die IgG-Antwort um den Faktor 13 niedriger ist. Bei gleichzeitiger Gabe von BpV wird die Immunantwort in Abhängigkeit von der SEB-Dosis um den Faktor 3 bis 15 (IgM), 2 bis 31 (IgG) bzw. 4 bis 34 (IgA) gesteigert, wobei der Adjuvanseffekt bei 2 µg SEB am stärksten ausgeprägt, bei 50 µg SEB jedoch mit Ausnahme der IgA-Antwort (Faktor 4) marginal ist.

Tabelle 1. Dosisabhängigkeit der systemischen Immunantwort von BALB/c Mäusen nach intranasaler Stimulierung mit SEB.

SEB-Dosis (µg)	BpV ^a	Zahl der Applikationen	ELISA-Titer (log)		
			IgM	IgG	IgA
50	+	4	3.6	5.5	3.0
	-		3.6	5.3	2.4
10	+	4	3.6	5.8	3.3
	-		3.0	5.2	1.7
2	+	4	3.7	5.6	3.1
	-		2.5	4.1	1.6

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden nach dem in Abb. 2 wiedergegebenen Schema IN mit SEB mit bzw. ohne BpV immunisiert. Die Blutentnahme erfolgte 13 Tage nach 4. IN Applikation.

3.2.2 Zeitkinetik der Isotyp-spezifischen anti-SEB Antwort

Zur Etablierung einer Zeitkinetik wurden BALB/c Mäuse fünfmal im Abstand von 14 Tagen mit 10 µg SEB in nach dem in Abb. 2 wiedergegebenen Schema immunisiert, wobei die Hälfte der Versuchstiere gleichzeitig BpV erhielt. Antisera wurden vor jeder Restimulierung, Bronchial- und Intestinalspülproben 14 Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen. Die Bestimmung von Antikörpern des IgM-, IgG- und IgA-Isotyps erfolgte mittels ELISA und die des IgE-Isotyps durch PCA in der Rattenhaut.

Die in Abb.3 wiedergegebenen, kinetischen Daten zeigen bereits nach der 2. Immunisierung hohe Konzentrationen zirkulierender IgG-Antikörper, die nach einer weiteren Stimulierung mit einem logarithmischen ELISA-Titer von 5.1 ihr Maximum erreichen. Eine im Prinzip analoge Kinetik zeigt die IgM-Antwort, während meßbare Konzentrationen von IgA-Antikörpern erst nach der 3. Immunisierung auftreten. Dabei erfolgte die Bestimmung von monomerem IgA mittels anti-IgA und die von dimerem sIgA mittels anti-SC, wobei die ermittelten Antikörperkonzentrationen in der gleichen Größenordnung lagen (Daten nicht gezeigt). Es ist deshalb davon auszugehen, daß sIgA für die IgA-Antwort nach IN Immunisierung mit SEB repräsentativ ist. Die Daten zeigen darüberhinaus, daß BpV die aerogen-induzierte, systemische IgG-Antwort um den Faktor 4 bis 19 und die des IgA-Isotyps um das 8 bis 42fache potenziert, während die IgM-Antwort lediglich um das 3fache gesteigert wird.

3.3 Systemische IgE anti-SEB Antwort

BALB/c Mäuse wurden fünfmal in 14-tägigem Intervall mit SEB IN immunisiert, 14 Tage nach dem letzten Antigenstimulus geblutet und die Antisera auf das Vorhandensein von IgE-Antikörpern (PCA-Titer) untersucht. Eine signifikante IgE-Antwort (PCA-Titer 1:33) war erst nach Stimulierung mit 50 µg SEB nachweisbar (Abb. 4), deren Titer sich jedoch durch BpV nur unwesentlich steigern ließ. Nach IN Stimulierung mit 10 µg SEB hingegen fanden sich lediglich marginale PCA-Titer, die durch BpV um den Faktor 16 gesteigert werden konnten. Die IN Applikation von 2 µg SEB führte nicht zu einer meßbaren IgE-Antwort.

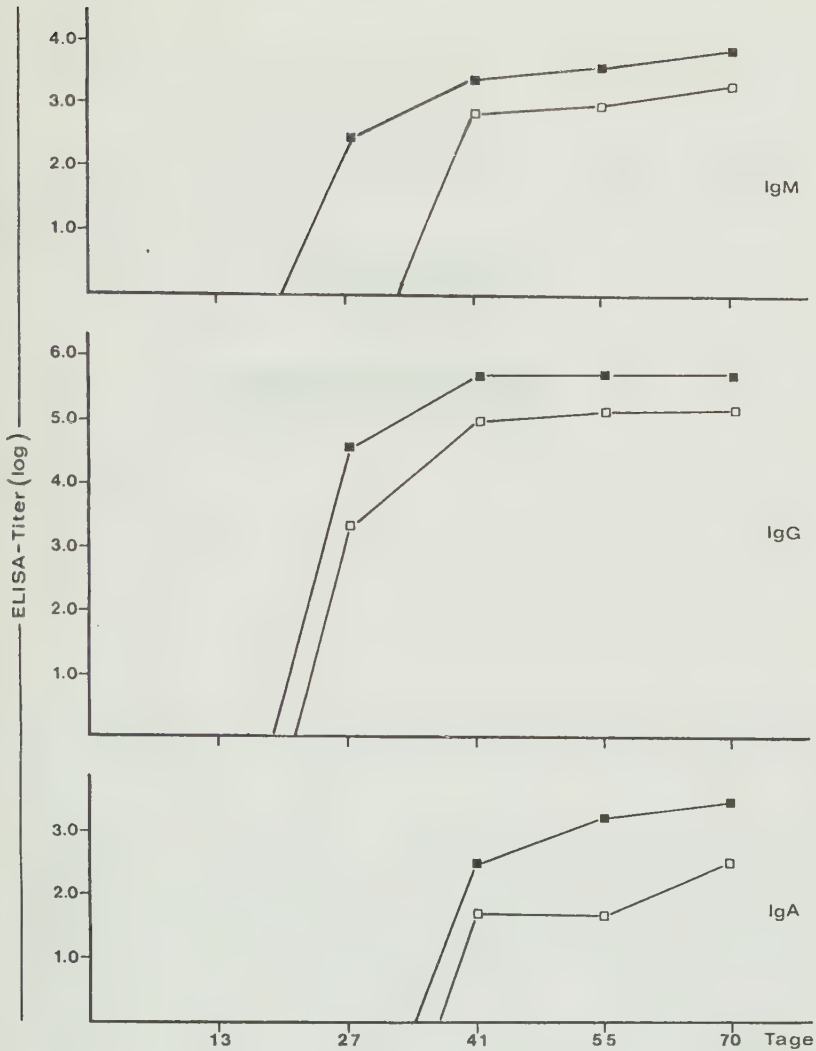


Abbildung 3. Kinetik der IgM-, IgG- und IgA-Immunantwort in BALB/c Mäusen nach intranasaler Applikation von SEB.

Die Applikation von 10 µg SEB mit (■) und ohne (□) BpV erfolgte fünfmal in 14-tägigem Intervall. Die Bestimmung Isotyp-spezifischer Antikörper erfolgte mittels ELISA, wobei die Konzentration als ELISA-Titer (log) angegeben ist. Die Kinetikprofile sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche. Experimentelle Details siehe Abb. 2.

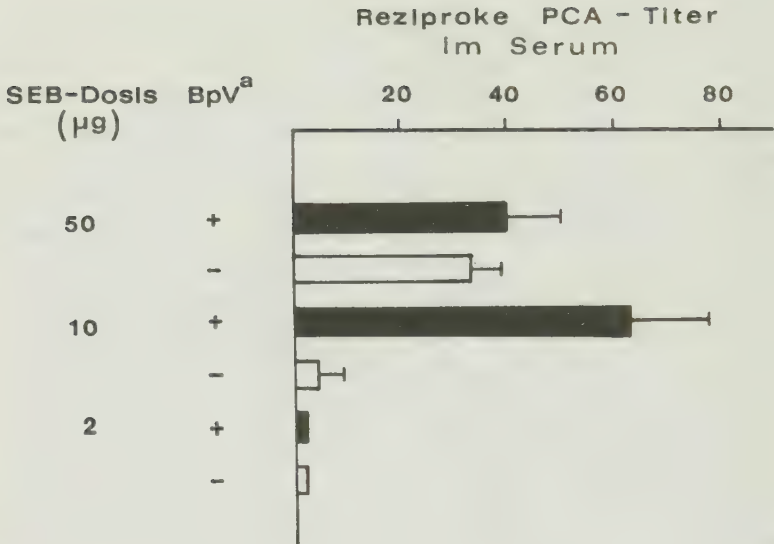


Abbildung 4. IgE anti-SEB Antwort (PCA-Titer) im Serum von BALB/c Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Immunisierung mit SEB.

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden im Abstand von 14 Tagen fünfmal intranasal mit SEB mit bzw. ohne BpV immunisiert und 14 Tage nach letztem Antigenstimulus entblutet. Kontrollgruppen nach korrespondierender Vorbehandlung mit 10 µg Eialbumin zeigten Nullwerte.

Die gezeigten PCA-Titer sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Mit dem Ziel, die Kinetik der IgE anti-SEB Antwort eingehender zu analysieren, wurden Antisera jeweils 2 Wochen nach der 1., 2. und 3. IN Stimulierung mit 10 µg SEB auf das Vorhandensein von IgE anti-SEB Antikörpern untersucht. IgE-Antikörper ließen sich erst nach dreimaliger Applikation mit SEB und BpV nachweisen, wobei jedoch nur niedrige Titer erreicht wurden (Daten nicht gezeigt).

3.4 Lokale anti-SEB Antwort

BALB/c Mäuse wurden zunächst fünfmal mit SEB im Dosisbereich von 2-50 µg IN stimuliert und in Bronchial- und Intestinalspülproben die isotypische Verteilung der Antikörperaktivität untersucht.

Wie die in Tabelle 2 wiedergegebenen Daten zeigen, werden nach fünfmaliger IN Stimulierung mit 2 µg SEB Antikörperkonzentrationen erreicht, die durch Erhöhung der SEB-Dosis auf 10 bzw. 50 µg lediglich um den Faktor 2 bis 3 gesteigert werden können. Simultane Applikation von BpV führt bei Dosen von 2 und 10 µg SEB zu einer Potenzierung der aerogen-induzierten IgM-, IgG- und IgA-Immunantwort um den Faktor 6 bis 9. Bei höheren Dosen (50 µg SEB) ist der Adjuvanseffekt mit Ausnahme der IgA-Antwort marginal.

Vergleichende Bestimmungen der Konzentration von IgA-Antikörpern mittels anti-IgA bzw. anti-SC ergab vergleichbare logarithmische ELISA-Titer. Dies spricht dafür, daß die nach IN Stimulierung in Bronchialspülproben nachweisbaren IgA-Antikörper bevorzugt vom sekretorischen Typ sind. BpV steigert die sIgA-Antwort in Abhängigkeit von der SEB-Dosis um den Faktor 7 (50 µg), 15 (10 µg) bzw. 19 (2 µg) (Tabelle 2). Da pathogene Makromoleküle im Mucosabereich durch sIgA komplexiert und anschließend durch das für sIgA spezifische Transportsystem hepatobiliär eliminiert werden können, kommt diesem Befund besondere Bedeutung zu.

In den Darmspülproben fanden sich Antikörper des IgG-, nicht jedoch solche des IgM-Isotyps (Tabelle 2). Lediglich durch BpV ließ sich auch die IgA-Antwort zu gerade meßbaren Konzentrationen steigern.

Tabelle 2. Isotypische Antikörperverteilung in Bronchial- und Intestinalspülproben von BALB c Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Immunisierung mit SEB.

SEB-Dosis (µg)	BpV ^a	ELISA-Titer (log)						
		Bronchialspülprobe				Intestinalspülprobe		
		IgM	IgG	IgA	sIgA	IgM	IgG	IgA
50	+	2.0	3.8	3.2	2.9	-	1.9	1.5
	-	1.9	3.5	2.5	2.0	-	2.2	-
10	+	2.4	4.1	3.1	2.9	-	2.2	1.0
	-	1.5	3.2	2.2	1.7	-	2.0	-
2	+	2.4	4.0	2.7	2.6	-	2.1	1.1
	-	1.6	3.1	1.9	1.3	-	1.7	-

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime Maus.
Experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 4.

Wie die in Tabelle 3 zusammengefaßten, kinetischen Daten zeigen, lassen sich nach zweimaliger IN Stimulierung mit SEB weder in Bronchial- noch in Intestinalspülproben anti-SEB Antikörper nachweisen. Simultane Applikation von SEB und BpV jedoch induziert ausschließlich eine IgG-Antwort, die nach weiterer Restimulierung um den Faktor 130 gesteigert werden kann. Antikörper des IgA- und IgM-Isotyps hingegen sind erst nach der 3. bzw. 5. Stimulierung nachweisbar.

Im Intestinalbereich kam es frühestens nach der 3. Antigenexposition zu einer IgG-Antwort, während IgA-Antikörper erst nach der 5. Stimulierung mit SEB und Adjuvans gefunden wurden. (Tabelle 3)

SEB-spezifische IgE-Antikörper ließen sich in Bronchial- und Intestinalspülproben zu keiner Zeit nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3. Kinetik der Isotyp-spezifischen Immunantwort in Bronchial- und Instestinalspülproben von BALB/c Mäusen nach intranasaler Stimulierung mit SEB.

SEB-Dosis (μg)	BpV ^a	Spülprobe	Isotyp	ELISA-Titer (log) Zahl der Immunisierungen				
				1.	2.	3.	5.	
10	+	Bronchial	IgM	-	-	-	2.4	
			IgG	-	2.0	2.9	4.1	
			IgA	-	-	1.6	3.1	
		Intestinal	IgM	-	-	-	-	
10	-		IgG	-	-	1.3	2.2	
			IgA	-	-	-	1.0	
		Bronchial	IgM	-	-	-	1.5	
			IgG	-	-	2.3	3.2	
			IgA	-	-	1.0	2.2	
		Intestinal	IgM	-	-	-	-	
			IgG	-	-	1.0	2.0	
			IgA	-	-	-	-	

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

Mäuse wurden jeweils 14 Tage nach intranasaler Stimulierung entblutet und Spülproben gewonnen. Weitere experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 4.

3.5 Immunantwort nach aerogener Stimulierung mit cSEB

Systemische Immunantwort

BALB/c Mäuse wurden fünfmal im Abstand von 14 Tagen mit 50, 10 bzw. 2 μg cSEB bzw. mit einer Standarddosis von 10 μg SEB mit und ohne BpV IN immunisiert. Antisera wurden vor jeder Restimulierung gewonnen und die Tiere 14 Tage nach der letzten Immunisierung entblutet.

Nach Applikation von 50 oder 10 μg cSEB zeigte sich bereits nach der 1. bzw. nach der 4. Stimulierung eine IgG-Antwort, die nach ein bis zwei weiteren Restimulierungen ihr Maximum erreichte (Abb. 5). Vergleichsweise lag das Maximum der IgG-Antwort nach Stimulierung mit nativem SEB um den Faktor 18 über dem von cSEB (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert ist, daß sich mit 2 μg cSEB unter den gewählten Bedingungen wohl eine IgA-, jedoch keine IgG-Antwort stimulieren läßt. Generell war frühestens nach der 3. bzw. 4. Immunisierung eine IgA-Antwort nachweisbar, die nach einer weiteren Restimulierung ihr Maximum erreichte. Die Bestimmung der Konzentration von IgA-Antikörpern erfolgte vergleichend mittels anti-IgA und anti-SC, wobei die ELISA-Titer in der gleichen Größenordnung lagen. Es ist deshalb davon auszugehen, daß es nach aerogener Stimulierung mit cSEB bevorzugt zur Bildung von sIgA kommt.

SEB-spezifische Antikörper des IgM-Isotyps waren bereits im Präimmunserum nachweisbar und ließen sich durch mehrfache IN Stimulierung nur geringgradig steigern (Daten nicht gezeigt). BpV verkürzte einmal die Latenzphase bis zum Eintritt der Immunantwort und führte zum anderen zu einer Potenzierung der IgG- und IgA-Antwort um ein Vielfaches, wobei der Adjuvanseffekt bei hoher Dosierung (50 μg cSEB) abgeschwächt war.

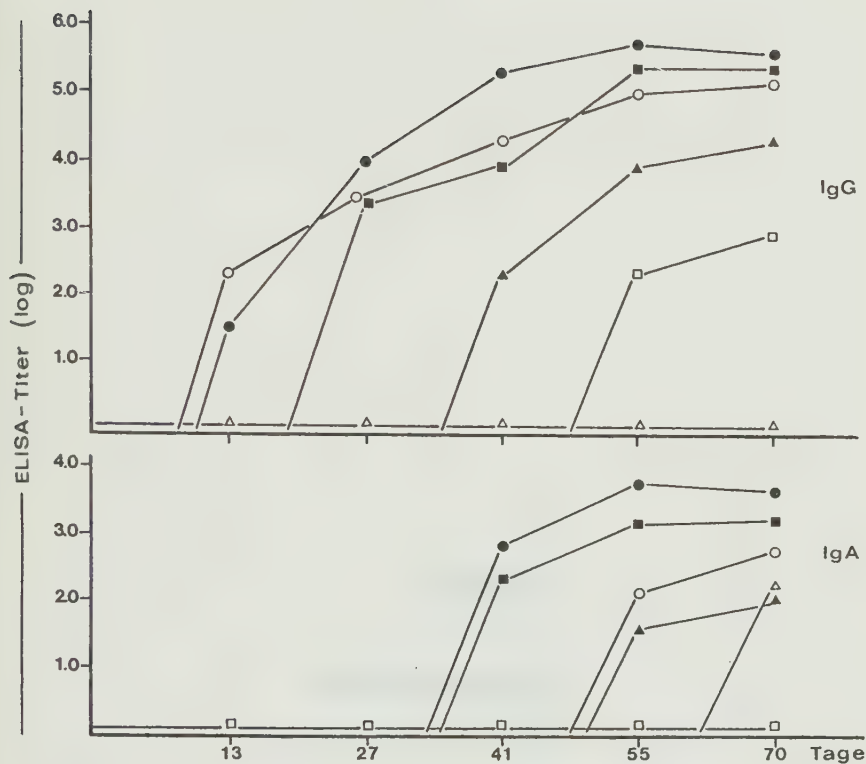


Abbildung 5. Kinetik der IgM-, IgG- und IgA-Immunantwort nach intranasaler Applikation von cSEB.

50 µg cSEB (●○), 10 µg cSEB (■□), 2 µg cSEB (▲△) mit (geschlossene Symbole) und ohne BpV (offene Symbole).

Experimentelle Details siehe Abb. 2 und Legende zu Abb. 3.

Untersuchungen zur IgE-Antwort erfolgten in BALB/c Mäusen, die fünfmal IN mit cSEB immunisiert, 14 Tage nach der letzten Stimulierung entblutet und deren Antisera auf IgE-Antikörper (PCA-Titer) analysiert wurden. 50 µg cSEB induziert, wie Abb. 6 zeigt, eine geringgradige IgE-Antwort, die sich durch simultane Gabe von BpV nicht steigern läßt. BpV potenziert jedoch die mit 10 µg cSEB stimulierte IgE-Antwort um ein Vielfaches. 2 µg cSEB ist weder mit noch ohne BpV dazu befähigt, eine IgE-Antwort zu induzieren.

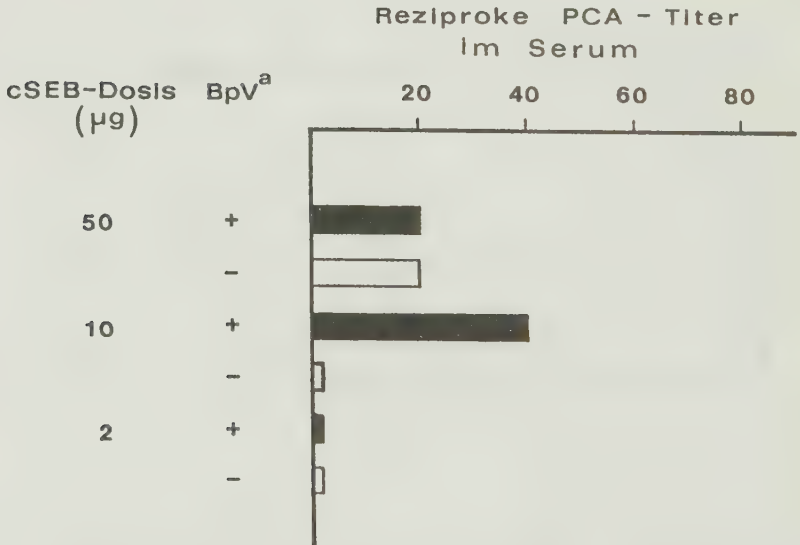


Abbildung 6. IgE anti-SEB Antwort (PCA-Titer) im Serum von BALB/c Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Immunisierung mit cSEB.

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.
Experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 4.

Lokale Immunantwort nach aerogener Stimulierung mit cSEB

Mit dem Ziel, die cSEB-induzierte, Mucosa-assoziierte Immunantwort zu untersuchen, wurden Mäuse 14 Tage nach fünfmaliger IN Stimulierung entblutet und Bronchial- und Intestinalspülproben gewonnen. Wie die in Tabelle 4 zusammengefaßten Daten zeigen, ist die Bronchus-induzierte Immunantwort unabhängig von der cSEB-Dosis überwiegend mit dem IgG-Isotyp assoziiert. Eine 50 µg Dosis von cSEB ist jedoch erforderlich, um eine lokale IgA-Antwort vom sekretorischen Typ zu induzieren.

Durch BpV läßt sich die IgG-Antwort dosisabhängig um den Faktor 9 bis 1200 und die des IgA-Isotyps um den Faktor 14 bis 650 gegenüber den Kontrollen steigern, wobei der Adjuvanseffekt bei niedriger Antigendosis (2 und 10 µg cSEB) besonders ausgeprägt ist.

In den Darmspülproben fanden sich geringe Konzentrationen von Antikörpern des IgG-Isotyps. Lediglich nach höherer Dosierung (50 µg cSEB) in Gegenwart von BpV waren in Intestinalspülproben auch meßbare Konzentrationen von IgA-Antikörpern nachweisbar. (Tabelle 4)

Antikörper des IgE-Isotyps fanden sich zu keinem Zeitpunkt in Bronchial- und Intestinalspülproben nach IN Stimulierung. (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4. Isotypische Antikörperverteilung in Bronchial- und Intestinalspülproben von BALB c Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Immunisierung mit cSEB.

cSEB- Dosis (µg)	BpV ^a	ELISA-Titer (log)						
		Bronchialspülprobe				Intestinalspülprobe		
		IgM	IgG	IgA	sIgA	IgM	IgG	IgA
50	+	1.7	4.0	2.9	2.6	-	1.7	1.1
	-	1.0	3.1	1.8	1.7	-	1.0	-
10	+	1.6	4.0	2.8	2.6	-	1.5	-
	-	-	0.9	-	-	-	-	-
2	+	-	2.6	1.6	1.4	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime Maus.
Experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 4.

3.6 Einfluß eines intranasalen Primärstimulus auf die parenteral-induzierte Immunantwort

Systemische Immunantwort

Mit dem Ziel, den Einfluß eines IN Primärstimulus auf die parenterale Restimulierung zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse ein-, zwei- oder dreimal im Abstand von 14 Tagen mit 10 µg SEB mit und ohne BpV IN immunisiert und einen Tag vor der parenteralen Restimulierung geblutet. Vier Wochen später wurden die Mäuse mit SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, IP restimuliert, 14 Tage danach entblutet und die erhaltenen Antisera auf Antikörperkonzentration und isotypische Verteilung untersucht.

Wie in Tabelle 5 zusammengefaßt, zeigen IN mit SEB vorbehandelte BALB/c Mäuse nach IP Restimulierung hohe Konzentrationen von IgG-Antikörpern, die abhängig von der Zahl IN Applikationen um den Faktor 3 bis 25 über der ausschließlich IP stimulierten Kontrolle liegen. Erst nach dreimaliger IN Immunisierung kommt es nach IP Restimulierung zu einer Steigerung der IgA-Antwort, während die IgM-Synthese unbeeinflusst bleibt.

Untersuchungen zur systemischen IgE-Antwort erfolgten in BALB/c Mäusen, die ein- oder mehrmals IN vorbehandelt, 4 Wochen später mit SEB und Alu-Gel-S IP restimuliert, 14 Tage danach geblutet und deren Antisera in der PCA auf IgE-Antikörper untersucht wurden. In Abhängigkeit von der Zahl der IN Immunisierungen mit SEB und BpV wurde nach IP Restimulierung eine zunehmende Suppression der IgE-Antwort beobachtet (Abb.7). IN Vorbehandlung mit SEB in Abwesenheit von BpV hingegen hatte keinerlei Einfluß auf die IgE-Antwort nach IP Restimulierung.

Tabelle 5. Isotypische Antikörperverteilung im Serum intranasal vorbehandelter BALB/c Mäuse nach intraperitonealer Restimulierung mit SEB.

Intranasale		ELISA-Titer (log) im Serum					
Immunisierung		vor			nach		
SEB	BpV ^a	intraperitonealer Restimulierung					
(10 µg)		IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
1 x	+	2.0	-	-	2.6	5.1	-
	-	2.1	-	-	2.6	5.1	-
2 x	+	2.3	3.3	-	2.5	5.9	-
	-	2.1	2.6	-	2.5	5.5	-
3 x	+	2.6	4.6	1.8	2.9	6.0	2.3
	-	2.2	2.7	-	2.8	5.6	-
EA ^b							
3 x	+	-	-	-	2.4	4.6	-

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

^bEA; Eialbumin, 10 µg.

Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden ein-, zwei- bzw. dreimal in 14-tägigem Intervall mit SEB mit bzw. ohne BpV intranasal immunisiert und 4 Wochen nach letztem Antigenstimulus intraperitoneal mit 10 µg SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, restimuliert. Die Tiere wurden 1 Tag vor intraperitonealer Restimulierung geblutet, 14 Tage danach entblutet und Bronchial- und Intestinalspülproben gewonnen.

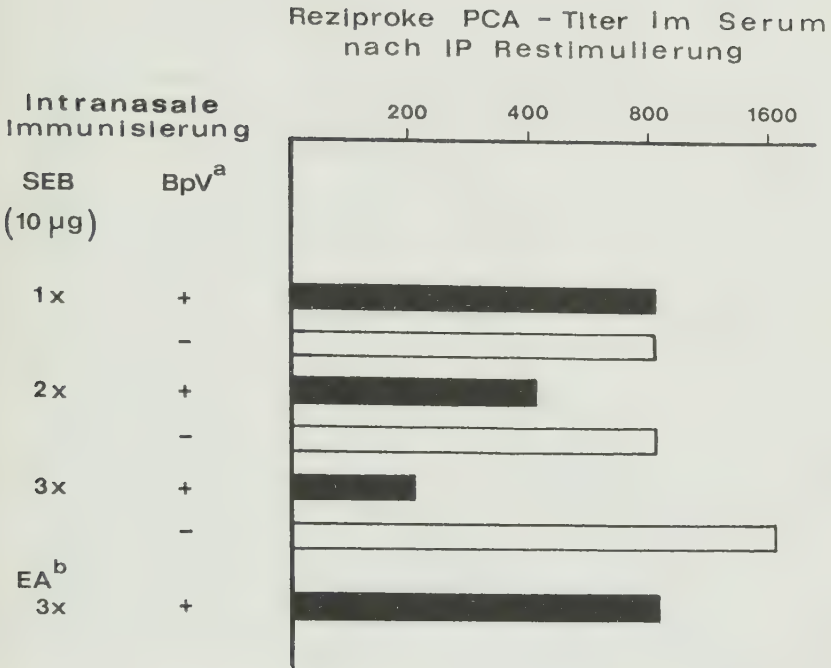


Abbildung 7. IgE anti-SEB Antwort (PCA-Titer) im Serum intranasal vorbehandelter BALB/c Mäuse nach intraperitonealer Restimulierung mit SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S.

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

^bEA; Eialbumin, 10 µg.

Experimentelle Details siehe Legende zu Tabelle 5.

Lokale Immunantwort

BALB/c Mäuse wurden ein- oder mehrmals IN mit SEB vorbehandelt, 14 Tage nach parenteraler Restimulierung entblutet, Spülproben gewonnen und mittels ELISA auf Antikörper analysiert, um den Einfluß einer IN Präexposition auf die Mucosa-assoziierte Immunantwort nach IP Restimulierung zu untersuchen.

Nach einmaligem IN Primärstimulus lassen sich nach IP Restimulierung, wie Tabelle 6 zeigt, in Bronchialspülproben lediglich IgG-Antikörper nachweisen, deren Konzentration durch mehrfache IN Vorbehandlung gesteigert werden kann. Eine weitere Potenzierung um den Faktor 2 bis 7 im Vergleich zu den Kontrollen erfolgte unter dem Einfluß von BpV. Antikörper des IgA-Isotyps waren erst nach dreimaliger IN Vorbehandlung mit SEB und BpV nachweisbar, wobei der Anteil von sIgA-Antikörpern etwa bei 20 % lag. Antikörper des IgM-Isotyps waren zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die experimentellen Daten zeigen, daß durch mehrfache IN Vorbehandlung mit SEB die bronchiale IgG-Antwort nach IP Restimulierung drastisch gesteigert wird und abhängig von der Zahl der IN Immunisierungen durch BpV auf das 200fache der ausschließlich parenteral stimulierten Kontrolle potenziert werden kann.

Von Interesse ist, daß IgG-Antikörper in Intestinalspülproben lediglich nach IN Vorbehandlung auftreten, wobei deren Konzentration durch BpV um den Faktor 3 bis 11 gesteigert werden kann. (Tabelle 6)

IgE-Antikörper waren lediglich nach dreimaliger IN Vorbehandlung mit SEB und BpV und parenteraler Restimulierung in marginalen Konzentrationen in Bronchialspülproben nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6. Isotypische Antikörperverteilung in Bronchial- und Intestinalspülproben von intranasal vorbehandelten BALB/c Mäusen nach intraperitonealer Restimulierung mit SEB.

Intranasale Immunisierung		ELISA-Titer (log)						
SEB	BpV ^a	nach IP Restimulierung						
(10 µg)		Bronchialspülprobe				Intestinalspülprobe		
		IgM	IgG	IgA	sIgA	IgM	IgG	IgA
1 x	+	-	2.0	-	-	-	1.8	-
	-	-	1.7	-	-	-	1.3	-
2 x	+	-	2.4	-	-	-	2.2	-
	-	-	2.1	-	-	-	1.2	-
3 x	+	-	3.3	1.3	0.5	-	2.7	-
	-	-	2.5	0.5	-	-	1.6	-
EA ^b								
3 x	+	-	1.0	-	-	-	-	-

^aBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

^bEA; Eialbumin, 10 µg.

Experimentelle Details siehe Legende zu Tabelle 5.

3.7 Einfluß eines parenteralen Primärstimulus auf die intranasal-induzierte Immunantwort

Systemische Immunantwort

Um den Einfluß eines parenteralen Primärstimulus auf die aerogen-induzierte Immunantwort zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse einmal mit 10 µg SEB mit und ohne Alu-Gel-S IP immunisiert und 14 Tage später fünfmal in wöchentlichen Abständen mit 10 µg SEB und BpV restimuliert. Die Tiere wurden vor je-

der Restimulierung geblutet, 10 Tage nach letzter IN Immunisierung entblutet und die erhaltenen Antisera auf Konzentration und Isotypverteilung von anti-SEB Antikörpern untersucht.

Nach parenteralem Primärstimulus mit und ohne Alu-Gel-S setzte die IN-induzierte IgG-Antwort zu einem früheren Zeitpunkt ein und erreichte höhere Titer als dies für die parenteral nicht vorbehandelten Kontrollen zutraf. Dabei wurde das Maximum der IgG-Antwort (logarithmischer ELISA-Titer 5.3) nach parenteraler Vorbehandlung nach der 3. und ohne parenteralem Primärstimulus nach der 4. IN Immunisierung erreicht (Abb.8). Im Vergleich hierzu lag die ausschließlich parenteral-induzierte IgG-Antwort durchschnittlich um den Faktor 25 niedriger (Daten nicht gezeigt). Die IgA-Antwort setzt, wie Abb. 8 zeigt, frühestens nach der 3. bzw. 4. IN Restimulierung ein und erreicht nach einer weiteren Applikation ihr Maximum, wobei es sich bevorzugt um IgA-Antikörper des sekretorischen Typs handelt (Daten nicht gezeigt).

Zur Analyse der IgE-Antwort erhielten BALB/c Mäuse einen parenteralen Primärstimulus, wurden anschließend fünfmal IN restimuliert, 10 Tage nach der letzten Immunisierung geblutet und die Antisera in der PCA an BS Ratten untersucht. Abb. 9 zeigt, daß die aerogen-induzierte IgE-Antwort nach parenteralem Primärstimulus im Vergleich zum Kontrollwert um den Faktor 5 bis 10 gesteigert wird.

Lokale Immunantwort

BALB/c Mäuse wurden parenteral immunisiert, 10 Tage nach fünfmaliger IN Restimulierung mit SEB und BpV entblutet, Spülproben gewonnen und mittels ELISA bzw. in der PCA auf Isotypspezifische Antikörper untersucht.

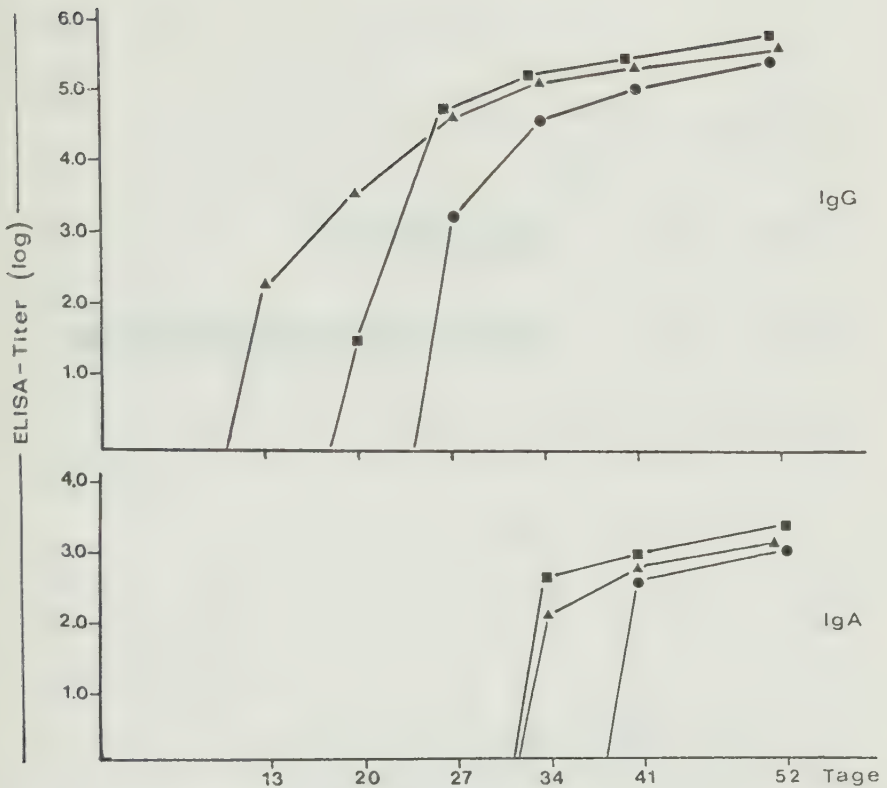


Abbildung 8. Einfluß eines parenteralen Primärstimulus auf Kinetik und isotypische Antikörperverteilung im Serum von BALB/c Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Applikation von SEB.

Gruppen von je 6 Mäusen erhielten 10 µg SEB mit (▲) bzw. ohne Alu-Gel-S (■) intraperitoneal und wurden 14 Tage später fünfmal in wöchentlichem Abstand mit 10 µg SEB und BpV intranasal restimuliert. Als Kontrollen dienten parenteral nicht vorbehandelte Mäuse (●). Weitere experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 3.

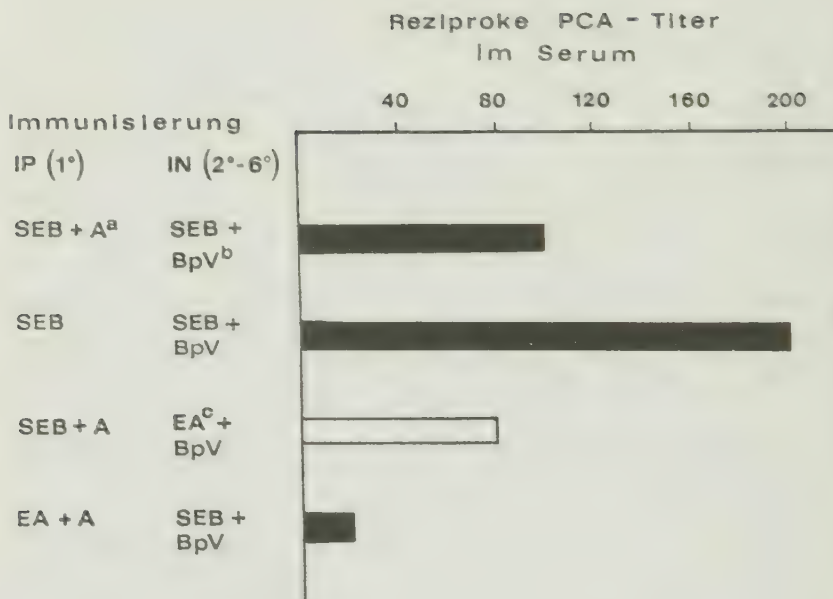


Abbildung 9. IgE anti-SEB Antwort (PCA-Titer) im Serum von BALB/c Mäusen nach intraperitonealem Primärstimulus und fünf-facher intranasaler Restimulierung mit SEB.

^aA; Alu-Gel-S, 0.1 ml.

^bBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime Maus.

^cEA; Eialbumin, 10 µg.

Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden mit 10 µg SEB mit und ohne Alu-Gel-S intraperitoneal stimuliert und 14 Tage danach fünfmal intranasal in wöchentlichem Abstand mit 10 µg SEB und BpV restimuliert. Kontrollgruppen erhielten Eialbumin statt SEB intraperitoneal bzw. intranasal. Die Mäuse wurden 10 Tage nach letzter intranasaler Restimulierung entblutet und Spülprouen gewonnen.

Wie die Daten in Tabelle 7 zeigen, enthalten Bronchialspülproben bevorzugt IgG-Antikörper, auf deren Konzentration ein parenteraler Primärstimulus keinen Einfluß hat. Diese liegt jedoch um den Faktor 60 über der nach ausschließlicher IP Stimulierung. Antikörper des IgA-Isotyps fanden sich in weit- aus geringeren Konzentrationen, wobei sIgA ausschließlich als Folge der IN Restimulierung auftrat. Analog der IgG-Antwort wurde auch die IgA-Antwort nach IN Restimulierung auf das 60-fache gesteigert. IgM-Antikörper waren lediglich nach IN Restimulierung in den Bronchialspülproben nachweisbar.

In den Intestinalspülproben fanden sich neben Antikörpern des IgG-Isotyps, geringe Konzentrationen von IgA-, jedoch keine IgM-Antikörper. Nach ausschließlich parenteraler Stimulierung gelang es jedoch nicht, in Intestinalspülproben SEB-spezifische Antikörper nachzuweisen.

Tabelle 7. Einfluß eines parenteralen Primärstimulus mit SEB auf die isotypische Antikörperverteilung in Bronchial- und Intestinalspülproben von BALB/c Mäusen nach fünffacher intranasaler Restimulierung.

Immunisierung		ELISA-Titer (log)						
IP	IN	Bronchialspülprobe				Intestinalspülprobe		
(1°)	(2°-6°)	IgM	IgG	IgA	sIgA	IgM	IgG	IgA
SEB+A ^a	SEB+BpV ^b	1.2	3.4	2.3	2.0	-	1.3	0.9
SEB	SEB+BpV	1.4	3.8	2.7	2.4	-	1.6	1.1
SEB+A	EA ^c +BpV	-	1.6	0.5	-	-	-	-
EA+A	SEB+BpV	0.7	3.4	2.2	2.1	-	1.8	1.0

^aA; Alu-Gel-S, 0.1 ml.

^bBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

^cEA; Eialbumin, 10 µg.

Experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 9.

3.8 Einfluß von LPS auf die intranasal-induzierte anti-SEB Antwort

Systemische Immunantwort

BALB/c Mäuse erhielten eine 10 µg SEB-Standardddosis simultan mit steigenden LPS-Dosen (1-100 µg) sechsmal in wöchentlichem Abstand IN. Antisera wurden jeweils 1 Tag vor jeder Restimulierung gewonnen und auf Isotyp-spezifische anti-SEB Antikörper untersucht.

Wie die in Abb. 10 wiedergegebenen, kinetischen Daten zeigen, induziert SEB in Abwesenheit von LPS frühestens nach der 3. IN Stimulierung eine IgG-Antwort. In Kombination mit LPS hingegen setzt die IgG-Antwort früher ein und erreicht 6 bis 10 fach höhere Konzentrationen. Das gleiche Prinzip gilt für die IgA-Antwort, die in Abhängigkeit von der LPS-Dosis um das 4 bis 6fache über dem Kontrollwert liegt. LPS zeigte jedoch keinerlei Einfluß auf die Synthese von IgM-Antikörpern (Daten nicht gezeigt).

Aus den Daten ist zu schließen, daß aerogen verabreichtes LPS keinen der oralen Toleranz (78) vergleichbaren Effekt induziert, sondern als Adjuvans fungiert.

Wichtig erscheint es jedoch, darauf hinzuweisen, daß bei einer Dosierung von 100 µg LPS in Kombination mit 10 µg SEB die Letalität zwischen 50 und 80 % lag.

Um den Einfluß einer aerogenen Vorbehandlung mit SEB und LPS auf die parenteral-induzierte Immunantwort zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse sechsmal in wöchentlichem Abstand IN vorbehandelt und 16 und 18 Wochen später, nach Abklingen der aerogen-induzierten Immunantwort, mit SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, IP restimuliert. Hierbei kam es zu einer Restimulierung der IgG- und IgA-Antwort auf einem der aerogen-vermittelten Immunantwort vergleichbaren Niveau. Im Prinzip zu gleichen Ergebnissen führte die Restimulierung mit SEB und Adjuvans nach aerogener Vorbehandlung mit detoxifiziertem cSEB und 10 µg LPS (Daten nicht gezeigt).

Hieraus ist zu schließen, daß eine der oralen Toleranz analoge Situation aerogen unter den gewählten Bedingungen nicht zu induzieren ist.

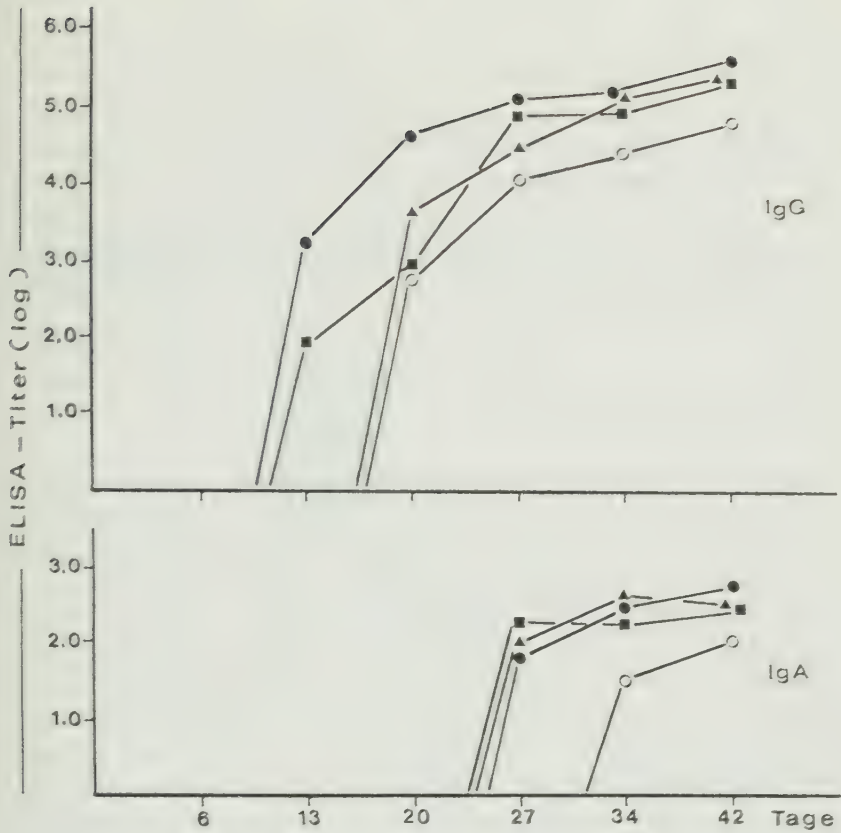


Abbildung 10. Einfluß von Lipopolysaccharid auf die Kinetik der Isotyp-spezifischen, systemischen Immunantwort von BALB/c Mäusen nach intranasaler Immunisierung mit SEB.

Gruppen von je 6 Mäusen erhielten sechsmal in wöchentlichem Abstand 10 µg SEB und 100 µg (●), 10 µg (▲) bzw. 1 µg (■) LPS simultan intranasal. Als Kontrollen dienten mit 10 µg SEB immunisierte Mäuse (○).

Weitere experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 1.

Für spezifische Untersuchungen zur IgE-Antwort wurden BALB c Mäuse sechsmal aerogen mit SEB und LPS vorbehandelt, 10 und 24 Tage danach parenteral restimuliert und gewonnene Antisera in der PCA untersucht. Abb. 11 zeigt, daß die parenteral restimulierbare IgE-Antwort gegenüber den parenteralen Kontrollen auf 1/10 der Antikörperkonzentration reduziert ist. Dies entspricht dem Bild einer IgE Isotyp-spezifischen, aerogenen Toleranz, die auch von anderen Autoren gefunden wurde (26, 35).

Lokale Immunantwort

10 Tage nach sechsmaliger IN Vorbehandlung mit SEB kombiniert mit steigenden LPS-Dosen (1-100 µg) wurden die Versuchsgruppen zweimal im Abstand von 14 Tagen IP restimuliert, 10 Tage später entblutet und Bronchial- und Intestinalspülproben gewonnen.

Wie die in Tabelle 8 zusammengefaßten Daten zeigen, ist die Immunantwort in den Bronchialspülproben überwiegend mit Antikörpern des IgG-Isotyps assoziiert, wobei LPS auf die Antikörperkonzentrationen keinerlei Einfluß hat. Die sechsmalige IN Immunisierung mit SEB allein bzw. in Kombination mit LPS führte zu einer Steigerung der parenteral-induzierten IgG-Antwort, die durchschnittlich um den Faktor 25 über der ausschließlich IP stimulierten Kontrolle lag. Antikörper des IgA- und IgM-Isotyps erwiesen sich als streng abhängig von aerogener Applikation des Antigens.

In den Intestinalspülproben fanden sich nahezu ausschließlich IgG-Antikörper und lediglich marginale Konzentrationen solcher des IgA-Isotyps (Tabelle 8).

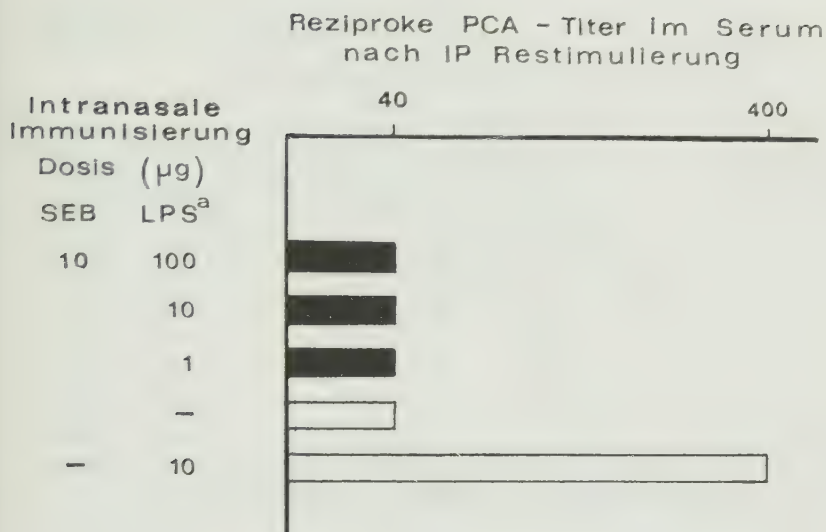


Abbildung 11. IgE anti-SEB Antwort (PCA-Titer) im Serum von BALB/c Mäusen nach intranasaler Vorbehandlung mit SEB und LPS und parenteraler Restimulierung.

^aLPS; Lipopolysaccharid aus *Salmonella minnesota* R-595.

Gruppen von je 6 Mäusen wurden sechsmal in wöchentlichem Abstand mit SEB und LPS (1-100 µg) intranasal immunisiert, und 10 und 24 Tage nach letztem Antigenstimulus intraperitoneal mit 10 µg SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, restimuliert. Die Mäuse wurden 10 Tage danach entblutet und Bronchial- und Intestinalspülproben gewonnen.

Tabelle 8. Isotypische Antikörperverteilung in Bronchial- und Intestinalspülproben von BALB/c Mäusen nach sechsmaliger intranasaler Immunisierung mit SEB und LPS und parenteraler Restimulierung mit SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S.

Dosis (μ g)		ELISA-Titer (log) nach IP Restimulierung						
SEB	LPS ^a	Bronchialspülprobe				Intestinalspülprobe		
		IgM	IgG	IgA	sIgA	IgM	IgG	IgA
10	100	1.3	3.7	2.4	2.3	-	2.1	0.8
	10	0.6	3.3	1.7	1.6	-	2.6	0.8
	1	1.1	3.3	1.6	1.5	-	2.6	0.6
	-	1.0	3.2	1.2	1.1	-	2.6	0.7
-	10	-	2.0	-	-	-	1.9	-

^aLPS; Lipopolysaccharid aus Salmonella minnesota R-595.

Experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 11.

Zusätzlich wurden 10 Tage nach mehrfacher IN Immunisierung mit 10 μ g SEB und LPS (1 bzw. 10 μ g) ohne IP Restimulierung Spülproben gewonnen und auf anti-SEB Antikörper untersucht, wobei die ermittelten ELISA-Titer im wesentlichen mit den in Tabelle 8 wiedergegebenen Werten korrespondierten (Daten nicht gezeigt).

SEB-spezifische Antikörper des IgE-Isotyps konnten weder in Bronchial- noch in den Intestinalspülproben nachgewiesen werden.

3.9 Einfluß einer aerogenen Vorbehandlung mit LPS auf die intranasal-induzierte anti-SEB Antwort

Systemische Immunantwort

Um den Einfluß einer aerogenen Vorbehandlung mit LPS auf die intranasal mit SEB induzierte Immunantwort eingehender zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse fünfmal in 14-tägigem Intervall mit LPS IN vorbehandelt und jeweils 5 Tage später mit SEB bzw. cSEB stimuliert. Kontrollgruppen erhielten SEB und LPS simultan bzw. SEB allein. Antisera wurden jeweils 7 Tage nach IN Antigenapplikation gewonnen und auf isotypische Verteilung von anti-SEB Antikörpern untersucht.

Durch simultane Applikation von LPS und SEB kommt es, wie die in Abb. 12 wiedergegebenen, kinetischen Daten zeigen, im Gegensatz zur Vorbehandlung mit LPS zu einer Potenzierung der IgG-Antwort, wobei die Maxima der Antikörperkonzentrationen um den Faktor 30 (SEB-Kontrolle) bzw. 44 differieren.

Das gleiche gilt im Prinzip für die IgA-Antwort, die nach Vorbehandlung mit LPS jedoch später einsetzt und deren Maximum im Vergleich mit dem nach simultaner Applikation von LPS und SEB um das 92fache, im Vergleich zur SEB-Kontrolle um das 23fache niedriger liegt. Somit führte im Gegensatz zur simultanen Stimulierung mit LPS und SEB, die Vorbehandlung mit LPS zu keiner Steigerung der IgA-Antwort.

Die Konzentration der bereits im Präimmunserum vorhandenen IgM-Antikörper wurde durch Vorbehandlung mit LPS nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

cSEB induzierte nach Vorbehandlung mit LPS eine IgG- bzw. IgA-Antwort, deren Kinetik und isotypische Verteilung weitgehend mit den in Abb. 12 wiedergegebenen Daten übereinstimmte. Nach IN Applikation von 10 µg cSEB allein kam es jedoch zu einer verzögert einsetzenden IgG-, nicht jedoch zur IgA-Antwort (Daten nicht gezeigt).

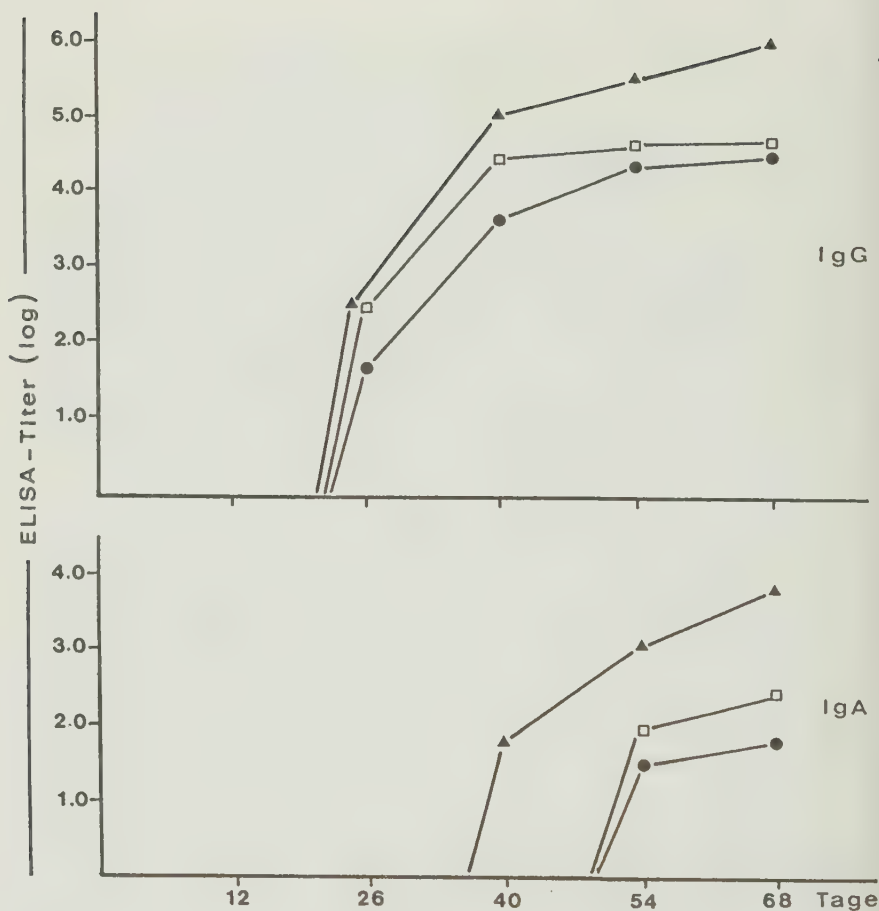


Abbildung 12. Einfluß von Lipopolysaccharid auf die Isotypspezifische, systemische anti-SEB Antwort.

Je 6 BALB/c Mäuse erhielten 10 μg LPS und 5 Tage später 10 μg SEB intranasal (●); Vergleichsgruppen wurden fünfmal im Abstand von 14 Tagen mit 10 μg SEB allein (□) bzw. SEB und LPS simultan (▲) nach dem gleichen Modus immunisiert.

Weitere experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 3.

Lokale Immunantwort

10 Tage nach fünffacher IN Vorbehandlung mit LPS bzw. simultaner Applikation von SEB und LPS mit nachfolgender IP Restimulierung wurden Mäuse entblutet, Bronchial- und Intestinalspülproben gewonnen und die Konzentration von anti-SEB Antikörpern und deren isotypische Verteilung untersucht.

Wie die in Tabelle 9 zusammengefaßten Daten zeigen, steigert die simultane, aerogene Stimulierung mit LPS und SEB nach parenteraler Restimulierung die IgG- und IgA-Antwort, wobei die Konzentrationsmaxima um den Faktor 9 (IgA) bzw. 13 (IgG) über allein mit SEB vorbehandelten Kontrollen liegen. Durch vergleichende Analysen von IgA-Antikörpern mittels anti-IgA bzw. anti-SC wurde gezeigt, daß es sich ausschließlich um solche des sekretorischen Typs handelte. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, daß die IN Vorbehandlung mit LPS 5 Tage vor dem Antigenstimulus zu einer aerogenen IgA-Toleranz führt.

Eine im Prinzip vergleichbare IgG- und IgA-Antwort ließ sich nachweisen, wenn SEB durch cSEB substituiert wurde (Daten nicht gezeigt).

In den Intestinalspülproben fanden sich nahezu ausschließlich IgG-Antikörper, deren Konzentration jedoch signifikant niedriger als die in Bronchialspülproben war. Geringe Antikörperkonzentrationen des IgA-Isotyps waren nur nach simultaner IN Vorbehandlung mit SEB und LPS nachweisbar.

Meßbare Konzentrationen von IgE anti-SEB Antikörpern fanden sich weder in Bronchial- noch in Intestinalspülproben.

Tabelle 9. Isotypische Antikörperverteilung in Bronchial- und Intestinalspülproben von BALB/c Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Immunisierung und intraperitonealer Restimulierung mit SEB.

Intranasale Immunisierung		ELISA-Titer (log) nach IP Restimulierung						
		Bronchialspülprobe				Intestinalspülprobe		
Tag 0	Tag 5	IgM	IgG	IgA	sIgA	IgM	IgG	IgA
NaCl	SEB ^a	-	2.8	1.4	1.4	-	2.1	-
LPS ^b	SEB	1.3	2.9	-	-	-	1.5	-
NaCl	SEB + LPS	0.9	3.9	2.4	2.2	-	2.4	0.6
LPS	EA ^c	-	2.4	-	-	-	1.0	-

^aSEB; 10 µg.

^bLPS; Lipopolysaccharid aus *Salmonella minnesota* R-595, 10 µg.

^cEA; Eialbumin, 10 µg.

Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden fünfmal in 14-tägigem Abstand intranasal vorbehandelt, 10 und 24 Tage nach letztem Antigenstimulus intraperitoneal mit SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, restimuliert und 10 Tage später Spülproben gewonnen.

3.10 Aerogene Intoxikation mit SEB

Erstmals wird hier ein Modell mit der LPS-areaktiven C3H/HeJ Maus vorgestellt, für die neben dem Primaten SEB jedoch nur nach aerogener Applikation in hohem Maß toxisch ist. So führt IN verabreichtes SEB bis zu einer Dosis von 10 µg zu 100 % Letalität, während nach 5 µg SEB noch 4 von 6 Mäusen sterben.

Aus der Tatsache, daß aerogen verabreichtes SEB im Dosisbereich von 5 bis 50 µg auch für kongene C3H/HeN- und C3H/f-, nicht jedoch für LPS-areaktive C57BL/10ScCr-Mäuse letal ist, darf geschlossen werden, daß die Empfindlichkeit gegenüber SEB nicht mit der LPS-Areaktivität assoziiert ist. Es spricht jedoch vieles dafür, daß die Sensitivität gegenüber SEB eine C3H-immanente Eigenschaft ist, die unter genetischer Kontrolle steht.

Orale bzw. parenterale Applikation von SEB hingegen induzierte weder klinische Symptome noch Letalität.

3.11 Einfluß von LPS auf die aerogen-induzierte Immunantwort im C3H/HeJ Mausmodell

In einer Serie von Experimenten war es weiterhin von Interesse, den Einfluß von LPS auf die aerogen-induzierte Immunantwort in der LPS-areaktiven C3H/HeJ Maus zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden C3H/HeJ Mäuse fünfmal in wöchentlichem Abstand mit 2 µg SEB in Kombination mit steigenden Dosen LPS (1-100 µg) aerogen stimuliert und die lokale und systemische Immunantwort analysiert.

Wie Tabelle 10 zeigt, kommt es nach aero gener Stimulierung unabhängig von der LPS-Dosis zu einer lokalen und systemischen IgG-Antwort, die im Niveau der nach Immunisierung mit SEB und BpV sowie SEB allein entspricht. Via aero gener Route appliziertes SEB führte jedoch unter dem Einfluß von LPS zu systemischer IgA-Toleranz, während in Abwesenheit von LPS eine systemische IgA-Antwort entstand.

Tabelle 10. Isotypische Antikörperverteilung in Serum und Bronchialspülproben von C3H/HeJ Mäusen nach fünfmaliger intranasaler Immunisierung mit SEB.

Immunisierung			ELISA-Titer (log)					
SEB	LPS ^a	BpV ^b	Serum			Bronchialspülprobe		
(2µg)	(µg)		IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
+	100	-	2.2	5.1	-	-	3.3	1.5
+	10	-	2.2	4.8	-	-	2.9	1.2
+	1	-	2.1	5.0	-	-	3.1	1.1
+	-	+	2.3	5.1	2.3	-	2.9	1.1
+	-	-	2.3	5.0	1.8	-	2.6	1.0

^aLPS; Lipopolysaccharid aus *Salmonella minnesota* R-595.

^bBpV; *Bordetella pertussis* Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden fünfmal im wöchentlichen Abstand intranasal mit SEB mit und ohne BpV bzw. LPS stimuliert, 10 Tage nach dem letzten Antigenstimulus entblutet und Bronchial- und Intestinalspülproben gewonnen. In Intestinalspülproben waren ausschließlich marginale IgG-Antikörperkonzentrationen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.12 Einfluß der intranasal-induzierten Immunantwort auf die aerogene Intoxikation im C3H/HeJ Mausmodell

Für Untersuchungen zur protektiven lokalen und systemischen Immunität wurden C3H/HeJ Mäuse IN zweimal in 14-tägigem bzw. viermal in wöchentlichem Intervall mit 1 µg SEB und BpV stimuliert. Bei einer anderen Gruppe von Mäusen erfolgte die Stimulierung zweimal IP mit 1 µg SEB, adsorbiert an Alu-Gel-S, im Abstand von 14 Tagen. Zwei bis drei Wochen nach dem letzten Antigenstimulus erhielten je 5 Tiere aller Gruppen entweder 10 oder 50 µg SEB IN.

Wie Tabelle 11 zeigt, wird nach IP Immunisierung ausschließlich sowohl lokal als auch systemisch eine IgG-Antwort induziert, wobei die Überlebensrate in Abhängigkeit von der Belastungsdosis (10 oder 50 µg SEB) zwischen 60 und 100% liegt. Das gleiche gilt im Prinzip für die Belastbarkeit der Immunantwort nach zweimaliger, aerogener Applikation des Toxins. Die viermalige, aerogene Immunisierung mit SEB in Kombination mit BpV führt, neben einer IgG-, auch zu einer lokalen und systemischen IgA-Antwort. Die Überlebensraten liegen hier reproduzierbar bei 100 %. Die lokale Produktion von IgA-Antikörpern verleiht erwartungsgemäß eine zusätzliche Schutzfunktion. In Kontrollgruppen, die statt SEB Walmyoglobin erhielten, lagen die Überlebensraten bei 0 %.

C3H/f Mäuse zeigten nach viermaliger IN Applikation von SEB vergleichbare Überlebensraten.

Tabelle 11. Einfluß der intranasal- bzw. parenteral-induzierten Immunantwort in C3H/HeJ Mäusen^a auf die aerogene Intoxikation mit SEB.

Immunisierung (1 µg)	Applikation	Interval (Tage)	ELISA-Titer (log)		Bronchialspülprobe		Belastung SEB (µg)	Überlebens- rate (%)
			Serum	IgA	IgG	IgA		
SEB+A ^b	IP (2) ^d	14	5.3(5.6) ^e	- (-)	2.7(3.3)	- (0.8)	10	100
SEB+BpV ^c	IN (2)	14	3.5(4.8)	- (1.6)	1.4(2.7)	- (1.2)	10	60
							50	100
							10	80
SEB+BpV	IN (4)	7	4.8(4.7)	1.8(2.1)	2.6(2.5)	1.0(1.3)	10	100
							50	100
SEB	IN (4)	7	3.5(4.1)	- (1.8)	2.3(2.6)	- (0.9)	10	100
							50	80
Myoglobin +BpV	IN (2)	14	-	-	-	-	10	0

^aGruppen von jeweils 5 Mäusen.

^bA; Alu-Gel-S, 0.1 ml.

^cBpV; Bordetella pertussis Vakzine, 2.5×10^8 Keime/Maus.

^dZahl der Applikationen.

^eELISA-Titer (log) vor und nach () IN Belastung mit SEB.

4. DISKUSSION

Nach unserem gegenwärtigen Verständnis, vornehmlich gestützt auf experimentelle Modelle, gelingt es im Prinzip nach Immunisierungen via Mucosa neben einer lokalen eine systemische Immunantwort zu induzieren (79). Zum anderen kann es aber, insbesondere nach langfristiger oraler Antigenapplikation zum Phänomen der oralen Toleranz kommen, wobei die systemische neben einer uneingeschränkten lokalen Immunantwort drastisch reduziert ist (12). Möglicherweise kommt diesem Mechanismus bei allergischen Erkrankungen besondere Bedeutung zu, da die lokale, bei gleichzeitiger Abwesenheit einer systemischen Immunreaktion auf die IgE-Antwort einen regulierenden Einfluß ausübt. Bei dem zunehmenden Interesse für Mucosa-assoziierte Immunisierungen am Menschen, die der Vereinfachung des Verfahrens unter Praxisbedingungen dienen sollen, sind die Befunde am experimentellen Modell wegweisend. Die Reproduzierbarkeit der intestinalen Intoxikation beim Primaten nach oraler Applikation von SE läßt dieses Modell in hohem Maß als geeignet erscheinen, um die protektive Funktion einer lokalen bzw. systemischen Immunantwort vergleichend zu untersuchen.

In der Vergangenheit wurde in zahlreichen Experimenten am Affenmodell zwar im Prinzip gezeigt, daß durch subkutane, intravenöse oder perorale Immunisierung mit SE_s bzw. Enterotoxoiden ein belastbarer Schutz gegenüber Intoxikationen aufgebaut werden kann (referiert bei 73). Die Untersuchungen waren jedoch oft widersprüchlich, da protektive Antikörper nicht reproduzierbar nachgewiesen werden konnten (5,68).

Versuche, Menschen peroral mit SE-enthaltenden Kulturfiltraten zu immunisieren, waren bisher nicht erfolgreich (18). Nach mehrfacher, subkutaner Applikation von Formaldehyd-in-

aktiviertem Rohtoxin gelang es jedoch, Probanden gegenüber oraler Belastung zu schützen (19). Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung, daß systemische Immunität wohl gegenüber intravenöser, nicht jedoch gegenüber peroraler Belastung Schutz verleiht (47).

Da systematische Untersuchungen zur protektiven Funktion der lokalen und systemischen Immunantwort nach aerogener Applikation von SE am Affen gemessen an der Zahl der hierfür erforderlichen Versuche sowie aus tierschützerischen Gründen nicht durchzuführen sind, war es das Ziel dieser Arbeit, ein für diese Fragestellung geeignetes Mausmodell zu etablieren.

Erstmals wird mit dieser Arbeit ein SEB-sensitives Mausmodell vorgestellt und gezeigt, daß Stimulierungen via Respirationstrakt zu einer Mucosa-assoziierten und systemischen Immunantwort führen, die gegenüber einer aerogenen Belastung mit SEB vollständig schützt.

Zunächst wurden an BALB/c Mäusen jedoch die Modalitäten der aerogenen Immunisierung mit SEB untersucht und zur Bestimmung Isotyp-spezifischer Antikörper ein ELISA-System etabliert.

Einschränkend ist jedoch hierzu festzustellen, daß diese Methode lediglich eine semiquantitative Antikörperbestimmung erlaubt, da Konzentration und Affinität der verwendeten anti-Isotyp-Antikörper nicht definiert und diese somit nicht vergleichbar sind.

Auf der Basis einer Dosiskinetik wurden 10 µg SEB als optimale Immunisierungs-dosis ermittelt (Tabelle 1), wobei nach der 3. bzw. 4. Restimulierung via Respirationstrakt systemisch hohe IgG-Konzentrationen und ein drastischer Anstieg von IgA-Antikörpern nachgewiesen werden konnten (Abb. 3). Die Konzentration von IgM-Antikörpern hingegen ließ sich nach Stimulierung nur geringgradig steigern. Als Parameter für die lokale Immunantwort dienten Konzentrationsbestimmungen SEB-spezifischer Antikörper in Bronchial- und Intestinalspülproben. Nach

mehrfacher IN Restimulierung kam es im Bronchialbereich bevorzugt zur Bildung von Antikörpern des IgG-Isotyps und gleichzeitig zu einem drastischen Anstieg von IgA-Antikörpern, wobei es sich nahezu ausschließlich um solche des sekretorischen Typs (sIgA) handelte (Tabelle 2).

BpV erwies sich, kombiniert mit SEB nach aerogener Applikation als potentes Adjuvans, wodurch die lokale und systemische Immunantwort auf ein Vielfaches gesteigert wurde (Tabellen 1 und 2). Nach aerogener Antigenapplikation fand sich sowohl lokal als auch systemisch hingegen eine eher marginale IgE-Antwort (Abb. 4). Da beim Primaten die SE-induzierte Intoxikation in aller Regel peroral erfolgt, erschien es wichtig, am Mausmodell zu prüfen, ob eine Immunisierung via Respirationstrakt im Prinzip auch intestinal durch den Aufbau einer lokalen Immunantwort geschützt. Von Interesse ist hierbei die Tatsache, daß lediglich nach IN Applikation von SEB in Kombination mit BpV meßbare Konzentrationen von IgA-Antikörpern in Intestinalspülproben auftreten (Tabelle 2).

Durch zahlreiche Untersuchungen wurde gezeigt, daß die antigene Stimulierung via Mucosa als Hauptweg der IgA-Produktion zu gelten hat (33). Dies trifft zweifellos auch für die SEB-induzierte, Bronchus-assoziierte Immunantwort zu. Da IgA-B-Vorläuferzellen selektiv in mucöses Gewebe absiedeln (45), könnte die Milz einmal den wandernden Zellen als Zwischenstation dienen oder zum anderen als Zielorgan für die systemische IgA-Antwort fungieren. Was die IN stimulierbare, intestinale IgA-Antwort anbelangt, so besteht einmal die Möglichkeit, daß diese als Folge einer Wanderung von IgA-B-Vorläuferzellen von BALT in GALT eintritt, die hier zu IgA-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Da andererseits jedoch gezeigt werden konnte, daß in der Mucosa gebildetes sIgA selektiv über das Leberparenchym in die Galle transportiert

wird (25), könnten IgA-Antikörper nach aerogener Stimulierung auch auf hepatobiliärem Weg in den Darm gelangen. Wie neue Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Antigenen jedoch zeigen, werden zwischen 15 und 60 % des IN applizierten Antigens im Respirationstrakt wiedergefunden (35), und somit ist letztlich nicht auszuschließen, daß SEB mindestens teilweise via Gastro-Intestinaltrakt ausgeschieden wird und dort eine lokale Immunantwort induziert.

Die eigenen Daten zur IgE-Antwort stimmen mit den Befunden anderer Autoren überein (35), die jedoch zeigen konnten, daß es nach mehrfacher, aerogener Applikation lediglich zu einer passageren, systemischen Immunantwort kommt, die sich nach kontinuierlicher Antigenexposition weiter vermindert. So zeigte sich auch nach wiederholter IN Immunisierung mit SEB kombiniert mit BpV nach parenteraler Restimulierung eine drastische Reduktion der systemischen IgE-Antwort (Abb. 7). Somit ist die nach mehrfacher Restimulierung via Respirationstrakt resultierende Toleranz Antigen- und IgE Isotyp-spezifisch und betrifft die IgG-Antwort, wenn überhaupt, nur in geringem Umfang (65). Eine der oralen Toleranz (12) vergleichbare Situation, die auch Antikörper des IgG-Isotyps einschließt, ließ sich nach aerogener Stimulierung, selbst nach wöchentlicher SEB-Exposition, nicht beobachten. Die zelluläre Basis für die aerogen-induzierbare Toleranz bilden IgE Isotyp-spezifische T_S -Zellen, welche die Funktion der T_H -Zellpopulation hemmen. Sie sind in Zervikallymphknoten lokalisiert, die vornehmlich den oberen Bereich des Respirationstraktes drainieren (65). Das Auffinden IgE-sezernierender Zellen nach aerogener Stimulierung, die größtenteils aus respiratorischen Lymphknoten stammen, spricht dafür, daß die Exposition der bronchialen Mucosa gegenüber Allergenen als wesentlicher Stimulus für ein langfristig hohes IgE-Niveau beim Atopiker zu gelten hat (66).

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß es nach Stimulierung via Respirationstrakt mit SEB in Gegenwart von BpV gelingt, im Bronchial- und in geringerem Umfang auch im Intestinalbereich eine Immunantwort zu induzieren, deren Belastbarkeit jedoch nicht nachgeprüft werden konnte, da sich BALB/c Mäuse als SEB-resistent erwiesen.

Angesichts der hohen Toxizität von SEB für den Primaten ist es jedoch nicht möglich, die am Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse zur Mucosa-assoziierten und systemischen Immunantwort nach aerogener Stimulierung anwendungsorientiert einzusetzen. Jüngst konnte jedoch gezeigt werden, daß SEB, analog SE Typ A (74), durch Carboxymethylierung vollständig detoxifiziert werden kann (62). Da cSEB die Bindung von SEB an die für die toxische Aktion verantwortliche Zielzelle kompetitiv hemmt, ist davon auszugehen, daß Carboxymethylierung nicht zur Einschränkung der immunologischen Eigenschaften von SEB führt (62).

Dies wurde mittels Hemm-ELISA bestätigt und gezeigt, daß cSEB (10^{-9} M) in SEB (10^{-10} M)-vergleichbaren Konzentrationen die Reaktion zwischen anti-SEB und Festphasen-SEB hemmt (Abb. 1). Mit dem Ziel, das etablierte Mausmodell kritisch zu bewerten und gegebenenfalls dessen Grenzen und Möglichkeiten der Übertragbarkeit auf den Menschen aufzuzeigen, wurden vergleichende Untersuchungen zur cSEB- und SEB-induzierten Immunantwort durchgeführt. Dabei erwies sich cSEB im Vergleich mit SEB nach mehrfacher, aerogener Restimulierung als schwächer immunogen. Um mit cSEB eine SEB(10 µg)-vergleichbare, lokale und systemische Immunantwort nach aerogener Stimulierung zu induzieren, war es erforderlich, die Immunisierungs-dosis auf das 5fache (50 µg cSEB) zu erhöhen. In Kombination mit BpV ließ sich die Bronchus-assoziierte und systemische IgG- und IgA-Antwort um ein Vielfaches steigern. Dabei war der Adjuvansef-

fekt bei niedrigeren cSEB-Dosen (2 und 10 µg) besonders ausgeprägt (Abb. 5, Tabelle 4). Meßbare Konzentrationen SEB-spezifischer IgA-Antikörper im Intestinum zeigten sich erst nach aerogener Applikation von 50 µg cSEB-Dosen kombiniert mit BpV (Tabelle 4).

Zusammenfassend zeigen die experimentellen Daten, daß Carboxymethylierung von SEB zwar zu einer gewissen Einschränkung der Immunogenität führt, die jedoch durch Einsatz geeigneter Adjuvantien und höhere Dosierung kompensiert werden kann. Die in der Vergangenheit durchgeführten Verfahren zur Detoxifizierung von SE_g führten in der Regel zu Konformationsänderungen des Moleküls und hierdurch zu einer weitgehenden Einschränkung oder zum vollständigen Verlust der immunologischen Spezifität (15, 17). Somit erscheint cSEB für systematische Untersuchungen zur lokalen und systemischen Immunantwort beim Primaten nach Stimulierung via Respirationstrakt in hohem Maß geeignet.

Die durch wiederholte IN Applikation induzierte Bronchus-assoziierte und systemische IgA- und IgG-Antwort konnte durch einen parenteralen Primärstimulus nicht beeinflusst werden (Tabelle 7, Abb. 8). Lediglich die systemisch nachweisbare Konzentration von IgE-Antikörpern ließ sich hierdurch auf das 5 bis 10fache steigern (Abb. 9). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß die Darm-assoziierte und systemische Immunantwort nach peroraler Stimulierung durch einen parenteralen Primärstimulus ebenfalls potenziert wird (57). In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, daß nach ausschließlich parenteraler Immunisierung keine Mucosa-assoziierte Immunantwort entsteht. So ist davon auszugehen, daß die nach IP Stimulierung in Bronchial-, vereinzelt auch in Intestinalspülproben nachweisbaren, marginalen Konzentrationen von IgG-Antikörpern wahrscheinlich systemischer Herkunft sind (56).

Bereits seit 1975 ist bekannt, daß es nach langdauernder, peroraler Applikation von heterologen Erythrozyten zu oraler Toleranz kommt (3). Neuerdings wurde jedoch gezeigt, daß dieser Typ einer systemischen Toleranz nur in LPS-sensitiven (C3H/HeN), nicht jedoch in LPS-areaktiven Mäusestämmen (C3H/HeJ) induziert werden kann (48). Da, abgesehen von Untersuchungen im IgE-System (65), wenig über die Regulation einer aerogen-induzierten Immunantwort bekannt ist, wurde zunächst der Einfluß von LPS auf die Bronchus-assoziierte Immunreaktion im BALB/c Mausmodell untersucht. Die experimentellen Daten zeigen, daß LPS nach simultaner IN Applikation mit SEB sowohl die Bronchus-assoziierte als auch die systemische IgA- und IgG-Antwort auf ein Vielfaches der Kontrollwerte potenziert (Tabelle 9, Abb. 10 und 12). Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit neueren Untersuchungen, die zeigen, daß LPS bei der aerogen-induzierten Immunantwort als Adjuvans fungiert (49). Die Frage, ob LPS via BALT lokal oder nach Passage der Lungen-Blutsschranke systemisch stimuliert, läßt sich auf der Basis der eigenen Befunde nicht beantworten. Nach neueren Untersuchungen finden sich Makromoleküle nach aerogener Applikation in signifikanten Mengen in Blut und Lymphknoten (49,83), was dafür spricht, daß LPS wenigstens zum Teil systemisch wirkt. Andererseits konnte jedoch gezeigt werden, daß die Adjuvanseigenschaften von LPS in der Aktivierung von Mucosa-assoziierten Makrophagen bestehen, die über freigesetztes Interleukin 1 T_H -Zellen aktivieren (82). Somit könnten Alveolarmakrophagen als primäre Zielzelle für aerogen appliziertes LPS an der Potenzierung der lokalen Immunantwort beteiligt sein.

Werden BALB/c Mäuse jedoch jeweils 5 Tage vor der aerogenen SEB-Applikation mit LPS vorbehandelt, dann kommt es zu einer vollständigen Suppression der lokalen (Tabelle 9) und zu einer partiellen der systemischen IgA-Antwort (Abb. 12), wäh-

rend die IgG-Produktion im wesentlichen unbeeinflusst bleibt. Diese Form der Suppression wird auch beobachtet, wenn Mäuse einige Tage vor der oralen Applikation von Schafererythrozyten parenteral mit LPS vorbehandelt werden (81). Die zelluläre Basis für diesen Suppressionseffekt bilden T_S -Zellen im GALT, die in peripheres, lymphatisches Gewebe absiedeln und schließlich Toleranz vermitteln. Wenn auch die eigenen Untersuchungen keine Daten dafür liefern, so ist doch zu vermuten, daß die LPS-induzierte Suppression via Respirationstrakt in einer Paralyse von Alveolarmakrophagen zu suchen und deren intakte Funktion für die Induktion einer Immunantwort essentiell ist.

Die simultane IN Applikation von 10 µg SEB und 100 µg LPS war für 50 bis 80% der Mäuse letal. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Autoren (75), die darauf hinweisen, daß SEB die Empfindlichkeit von Kaninchen und Mäusen gegenüber LPS steigert, wobei die Beteiligung adrenerger Rezeptoren vermutet wird.

Ausgehend von der Beobachtung, daß die orale Toleranz lediglich in LPS-sensitiven C3H/HeN-, nicht jedoch in LPS-areaktiven C3H/HeJ-Mäusen induziert werden kann (48), wurde das C3H/HeJ Mausmodell gewählt, um Einfluß und Regulation von bzw. durch LPS auf die aerogen-induzierte Immunantwort eingehender zu untersuchen. Zunächst wurde in orientierenden Untersuchungen gezeigt, daß die bisher bei der BALB/c Maus eingesetzte, aerogene Standarddosis von 10 µg für die C3H/HeJ Maus in hohem Maß toxisch ist. Dies galt auch für die LPS-sensitive C3H/HeN- und C3H/f-Maus, während die LPS-areaktive C57BL/10ScCr Maus sich als resistent erwies. Es war deshalb erforderlich, die Dosis für Immunisierungen via Respirationstrakt auf 2 µg SEB zu reduzieren. In Kombination mit steigenden LPS-Dosen stimulierte SEB via Respirationstrakt eine lokale

und systemische IgG-Antwort und lediglich eine auf die bronchiale Mucosa beschränkte IgA-Antwort (Tabelle 10). Im Gegensatz hierzu gehört eine im Vergleich mit Kontrollen potenzierte IgA-Antwort zu den Charakteristika einer oral-induzierten Immunität (41).

Da die LPS-sensitive C3H/f Maus nach aerogener Applikation von SEB unter dem Einfluß von LPS eine der C3H/HeJ Maus vergleichbare Immunantwort zeigte, ist die Frage nach der Rolle von endogenem LPS bei der Toleranzinduktion via Respirations-trakt auf der Basis eigener Daten nicht zu beantworten.

Die systematischen Untersuchungen an der BALB/c Maus haben gezeigt, daß die mehrfache SEB-Exposition via Respirations-trakt mit Ausnahme des IgE-Systems eine parenteral restimulierbare Immunantwort induziert. Lediglich nach aerogener Vorbehandlung mit LPS 5 Tage vor der Stimulierung mit SEB via Respirationstrakt kommt es neben einer verminderten, systemischen Immunantwort zu einer kompletten, lokalen IgA Isotypspezifischen Toleranz. Die Gründe dafür, daß es nach aerogener Applikation von SEB nicht möglich ist, eine der oralen Toleranz analoge, systemische Suppression zu induzieren, sind vielschichtig. So ist einmal die Rolle von LPS und dessen Einfluß auf die Generierung einer oralen Toleranz keineswegs geklärt. Neuere Untersuchungen haben zeigen können, daß LPS-areaktive Mäuse lediglich nach oraler Applikation von Eialbumin, nicht jedoch nach einer solchen von Schafer erythrozyten tolerant gemacht werden können (52). Dies spricht dafür, daß nicht nur Antigenstruktur (80) und Dosierung, sondern auch Häufigkeit und zeitlicher Abstand von Applikationen das bestehende Gleichgewicht zwischen Stimulierung und Toleranz beeinflusst. Nachdem LPS-areaktive C3H/HeJ Mäuse nach peroraler Applikation von Schafer erythrozyten keine T_S -Zellen generieren (48), ist davon aufzugehen, daß T_S -Zellen, die normalerweise

nach Aufnahme von Nahrungsproteinen stimuliert werden, in hohem Maß von intestinalem LPS abhängig sind. Ob und inwieweit SEB selbst aufgrund seiner suppressiven Eigenschaften (58) zur Stimulierung von T_S -Zellen beitragen kann, ist nicht geklärt. Durch Analyse regulatorischer T-Zellen in Peyer'schen Platten und Milz wurde gezeigt, daß in LPS-sensitiven C3H/HeN Mäusen T_S -Zellen und in LPS-areaktiven C3H/HeJ Mäusen T_H -Zellen dominant sind (48,84). Die Befähigung zur systemischen Immunantwort in LPS-areaktiven C3H/HeJ Mäusen wird durch in den Peyer'schen Platten lokalisierte, sog. Contrasuppressor $T(T_{CS})$ -Zellen vermittelt, wodurch T_H -Zellen gegenüber suppressiven Mechanismen resistent werden (31,77). Konsequenterweise ist hieraus zu schließen, daß T_H - in Gegenwart von T_S -Zellen zur Brechung der oralen Toleranz führen. Da LPS im Prinzip T_H -Zellen substituieren kann (69), ist dies ein alternativer Weg, um mit der Induktion einer oralen Toleranz zu interferieren. Zum anderen reagiert LPS als B-Zell-Mitogen direkt mit B-Zellen und ist somit dazu befähigt, selbst in Gegenwart von T_S -Zellen eine systemische Immunantwort zu induzieren.

Schließlich wurde mit der LPS-areaktiven C3H/HeJ Maus ein Modell etabliert, das es erstmals gestattet, selektiv auf aerogenem, nicht jedoch auf oralem bzw. parenteralem Weg reproduzierbar Intoxikationen auszulösen. Da sich die LPS-areaktive C57BL/10ScCr Maus gegenüber SEB als resistent erweist, ist davon auszugehen, daß SEB-Empfindlichkeit und LPS-Areaktivität nicht assoziiert sind. Vielmehr ist zu vermuten, daß die SEB-Empfindlichkeit eine immanente Eigenschaft der C3H Maus und somit genetisch determiniert ist.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß nach parenteraler oder aerogener Stimulierung mit SEB in Kombination mit Adjuvantien eine Immunantwort induziert werden kann, die gegenüber einer Belastung mit SEB nahezu oder vollständig schützt. Mit Walmyoglobin immunisierte Kontrolltiere hingegen sterben nach

aerogener Belastung mit 10 µg SEB zu 100 %. Zur Analyse der protektiven Immunantwort wurden die lokale und systemische Antikörperkonzentration bestimmt und deren isotypische Verteilung vor und 10 Tage nach der Belastung mit SEB untersucht. Wenn auch IgG-Antikörper im Prinzip zu schützen vermögen, so wird erwartungsgemäß die Schutzfunktion durch lokal-produzierte Antikörper des sIgA-Isotyps optimiert (Tabelle 11). Da via BALB/c-produziertes sIgA durch lokale Diffusion oder auf dem Weg der Lymphdrainage in die Zirkulation gelangt und dort hepatobiliär in den Darm ausgeschieden wird (25), könnte dieser Weg für die Elimination von SEB von großer Bedeutung sein.

Mit dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, daß es im Prinzip möglich ist, via Respirationstrakt eine belastbare Immunantwort aufzubauen, die gegenüber einer aerogenen Intoxikation schützt. Die Tatsache, daß cSEB nach aerogener Applikation im BALB/c Mausmodell dazu befähigt ist, eine dem nativen Toxin vergleichbare Immunantwort zu induzieren, eröffnet neue Perspektiven. Das Konzept eines gemeinsamen Mucosa-assoziierten Immunsystems (9), wobei durch Immunisierung z.B. via Respirationsmucosa gleichzeitig Schutz in anderen Mucosa-Bereichen vermittelt wird, ist ein wichtiges Prinzip für neue Formen der Vakzination: Zum anderen eröffnet die Tatsache, daß cSEB nach aerogener Applikation im BALB/c Mausmodell dazu befähigt ist, eine dem nativen Toxin vergleichbare Immunantwort zu induzieren, neue Perspektiven für den Anwendungsbereich beim Menschen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im BALB/c Mausmodell wurden die Modalitäten der Immunantwort nach aerogener Applikation von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) untersucht. Dabei erfolgte die Bestimmung der Antikörperkonzentration und deren isotypische Verteilung in Antisera, Bronchial- und Intestinalspülproben mittels "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) und der Nachweis von IgE-Antikörpern durch passive, kutane Anaphylaxie (PCA) in der Ratenhaut.

Wiederholte intranasale Applikation von 10 µg SEB induzierte lokal und systemisch hohe Konzentrationen von IgG-Antikörpern und führte gleichzeitig zu einem drastischen Anstieg lokal-produzierter IgA-Antikörper vom sekretorischen Typ (sIgA).

Bordetella pertussis Vakzine (BpV) erwies sich bei aerogener Applikation in Kombination mit SEB als potentes Adjuvans, wodurch die Bronchus- und Darm-assoziierte sowie die systemische IgG- und IgA-Antwort auf ein Vielfaches gesteigert wurde. Mit Ausnahme der IgE-Antwort hatte ein parenteraler Primärstimulus keinen Einfluß auf das Niveau der via Respirationstrakt-induzierten Immunantwort. Carboxymethylierung der Histidinreste von SEB (cSEB), die zum vollständigen Verlust der Toxizität führt, bewirkte keine Einschränkung der immunologischen Spezifität. Wurde SEB durch cSEB substituiert, dann wurde nach aerogener Applikation eine dem Niveau des nativen Toxins vergleichbare, lokale und systemische Immunantwort induziert.

Bei simultaner, aerogener Applikation von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) ließ sich die SEB-induzierte, lokale und systemische IgG- und IgA-Antwort auf ein Vielfaches steigern. Die IgE-Antwort hingegen, war nach parenteraler Restimulierung aerogen vorbehandelter Mäuse drastisch supprimiert. Die

aerogene Vorbehandlung mit LPS 5 Tage vor dem Antigenstimulus jedoch resultierte in einer Suppression der via Respirationstrakt-induzierten, lokalen und systemischen IgA-Antwort. Im Gegensatz zur oralen Route reagierten BALB/c Mäuse nach aerogener Immunisierung mit SEB unter den gewählten Bedingungen auf eine parenterale Restimulierung mit einer normalen Immunantwort und nicht mit aerogener Toleranz.

Erstmals wird gezeigt, daß SEB nach aerogener Applikation für die LPS-areaktive C3H/HeJ- und die kongene C3H/HeN-, nicht jedoch für die LPS-areaktive C57BL/10ScCr-Maus in hohem Maß toxisch ist. Mit 1 µg SEB, d.h. 1/10 der für BALB/c Mäuse erforderlichen Dosis, ließ sich in C3H/HeJ Mäusen eine vergleichbare lokale und systemische Immunantwort induzieren. Die Daten beweisen überzeugend, daß eine via Respirationstrakt-vermittelte Immunantwort gegenüber einer aerogenen Belastung mit SEB vollständig schützt.

SUMMARY

LOCAL AND SYSTEMIC IMMUNE RESPONSE OF MICE AFTER AEROGENIC ADMINISTRATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B. REGULATION AND PROTECTIVE FUNCTION.

The modalities of immune response after aerogenic administration of staphylococcal enterotoxin B (SEB) were studied in BALB/c mice. The levels of antibodies and their isotypes in antisera, bronchial and intestinal washings were recorded using "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) and IgE antibodies were determined by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in the skin of rats.

Repeated intranasal administration of 10 µg SEB induced high local and systemic levels of IgG antibodies and simultaneously enhanced the concentrations of locally synthesized IgA antibodies of secretory type (sIgA). Bordetella pertussis vaccine (BpV) proved to be a potent adjuvant, administered simultaneously with SEB by the aerogenic route, augmenting the bronchus- and gut-associated and the systemic IgG and IgA response. Except the IgE response, parenteral priming didn't influence the level of intranasally induced immune response. Carboxymethylation of histidine residues of SEB (cSEB) causing a total loss of toxicity had no effect on the immunological specificity. Aerogenic immunization with cSEB led to a local and systemic immune response comparable to that induced by the native SEB.

The SEB-induced local and systemic IgG and IgA response was enhanced enormously by simultaneous aerogenic administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS). However, the IgE response was drastically suppressed after parenteral challenge of intranasally pretreated mice. Aerogenic pretreatment

with LPS 5 days before antigenic stimulation, however, resulted in a suppression of via bronchus-induced local and systemic IgA response.

In contrast to the oral route, BALB/c mice - under these experimental conditions - showed normal immune response after aerogenic immunization with SEB and parenteral restimulation, and did not develop aerogenic tolerance.

It was shown for the first time, that SEB proves to be toxic in LPS-nonresponsive C3H/HeJ and the congenic C3H/HeN mice, but not in the LPS-nonresponsive C57BL/10ScCr strain. In C3H/HeJ mice a dose of 1 μ g SEB, i.e. one tenth of required dose in BALB/c strain, provoked comparable local and systemic immune response.

The data present compelling evidence, that an immune response induction via respiratory tract prevents intoxication with SEB by the aerogenic route.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen, W.D., C.G. Smith, and P. Porter. 1973. Localization of intracellular immunoglobulin A in porcine intestinal mucosa using enzyme-labelled antibody. *Immunology* 25:55-70.
2. Andersson, J., F. Melchers, C. Galanos, and O. Lüderitz. 1973. The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes. *J. Exp. Med.* 137:943-953.
3. André, C., J.F. Heremans, J.P. Vaerman, and C.L. Cambiaso. 1975. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: Antigen-antibody complexes *J. Exp. Med.* 142:1509-1519.
4. Bamberger, U., P.H. Scheuber, B. Sailer-Kramer, K. Bartsch, A. Hartmann, G. Beck, and D.K. Hammer. 1986. Anti-idiotypic antibodies that inhibit immediate-type skin reactions in unsensitized monkeys on challenge with staphylococcal enterotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7054-7058.
5. Bergdoll, M.S. 1966. Immunization of rhesus monkeys with enterotoxoid B. *J. Infect. Dis.* 116:191-196.
6. Bergdoll, M.S. 1970. Enterotoxins, p. 265-326. In: S.J. Ajil, T.C. Montie, and S. Kadis (ed.), *Microbial toxins*, vol. 3. Academic Press, New York.

7. Bergdoll, M.S., I.-Y. Huang, and E.J. Schantz. 1974. Chemistry of the staphylococcal enterotoxins. *J. Agric. Food Chem.* 22:9-13.
8. Bergdoll, M.S. 1983. Enterotoxins, p.559-598. In: C.S.F. Easmon, and C. Adlam (ed.), *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol. 2. Academic Press, London.
9. Bienenstock, J., M. McDermott, and D. Befus. 1979. A common mucosal immune system, p. 91-104. In: P.L. Ogra, and D. Dayton (ed.), *Immunology of the breast milk*. Raven Press, New York.
10. Brandtzaeg, P., I. Fjellanger, and S.T. Gjeruldsen. 1968. Immunoglobulin M: Local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* 160:789-791.
11. Brandtzaeg, P. 1978. Polymeric IgA is complexed with secretory component (SC) on the surface of human intestinal epithelial cells. *Scand. J. Immunol.* 8:39-52.
12. Challacombe, S.J., and T.B. Tomasi. 1980. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J. Exp. Med.* 152:1459-1472.
13. Chiller, J.M., B.J. Skidmore, D.C. Morrison, and W.O. Weigle. 1973. Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvanticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2129-2133.
14. Chu, F.S. 1968. Hydrogen ion equilibria of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biol. Chem.* 243:4342-4349.

15. Chu, F.S., and M.S. Bergdoll. 1969. Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B. I. Alkylation and oxidation of methionine residues. *Biochim. Biophys. Acta* 194:279-286.
16. Chu, F.S., and E. Crary. 1969. Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B. II. Carboxyl residues. *Biochim. Biophys. Acta* 194:287-292.
17. Chu, F.S., E. Crary, and M.S. Bergdoll. 1969. Chemical modification of amino groups in staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry* 8:2890-2896.
18. Dolman, C.E. 1943. Bacterial food poisoning. Part II. *Can. J. Public Health* 34:205-235.
19. Dolman, C.E. 1944. Antigenic properties of staphylococcus enterotoxin. *Can. J. Public Health* 35:337-351.
20. Elson, C.O., J.A. Heck, and W. Strober. 1979. T-cell regulation of murine IgA synthesis. *J. Exp. Med.* 149:632-643.
21. Elwell, M.R., C.T. Liu, R.O. Spertzel, and W.R. Beisel. 1975. Mechanisms of oral staphylococcal enterotoxin B-induced emesis in the monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:424-427.
22. Ende, I.A., G. Terplan, G. Kickhöfen, and D.K. Hammer. 1983. Chromatofocusing: A new method for purification of staphylococcal enterotoxins B and C₁. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1323-1330.

23. Engvall, E., and P. Perlmann. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109:129-135.
24. Farthing, J.R. 1961. The role of Bordetella pertussis as an adjuvant to antibody production. *Brit. J. exp. Path.* 42:614-622.
25. Fisher, M.M., B. Nagy, H. Bazin, and B.J. Underdown. 1979. Biliary transport of IgA: Role of secretory component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2008-2012.
26. Fox, P.C., and R.P. Siraganian. 1981. IgE antibody suppression following aerosol exposure to antigens. *Immunology* 43:227-234.
27. Galanos, C., M.A. Freudenberg, O. Lüderitz, E.T. Rietchel, and O. Westphal. 1979. Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides, p. 321-332. In: *Biomedical applications of the horseshoe crab (Limulidae)*. Alan R. Liss, Inc., New York.
28. Gearhart, P.J., and J.J. Cebra. 1979. Differentiated B lymphocytes. Potential to express particular antibody variable and constant regions depends on site of lymphoid tissue and antigen load. *J. Exp. Med.* 149:216-227.
29. Gerbrandy, J.L.F., and E.A. van Dura. 1972. Anamnestic secretory antibody response in respiratory secretions of intranasally immunized mice. *J. Immunol.* 109:1146-1148.

30. Gerbrandy, J.L.F., and J. Bienenstock. 1976. Kinetics and localization of IgE tetanus antibody response in mice immunized by the intratracheal, intraperitoneal, and subcutaneous routes. *Immunology* 31:913-919.
31. Green, D.R., P.M. Flood, and R.K. Gershon. 1983. Immunoregulatory T-cell pathways. *Ann. Rev. Immunol.* 1:439-463.
32. Harris, C.M., and R.L. Hill. 1969. The carboxymethylation of human metmyoglobin. *J. Biol. Chem.* 244:2195-2203.
33. Heremans, J.F. 1974. Immunoglobulin A, p.365-522. In: M. Sela(ed.), *The antigens*, vol.2. Academic Press, New York.
34. Hohmann, A., J. LaBrooy, G.P. Davidson, and D.J.C. Shearman. 1983. Measurement of specific antibodies in human intestinal aspirate: Effect of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride. *J. Immunol. Meth.* 64:199-204.
35. Holt, P.G., J.E. Batty, and K. Turner. 1981. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 42:409-417.
36. Huang, I.-Y., and M.S. Bergdoll. 1970. The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. III. The cyanogen bromide peptides of reduced aminoethylated enterotoxin B, and the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 245:3518-3525.
37. Huang, I.-Y., E.J. Schantz, and M.S. Bergdoll. 1975. The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 27:73-75.

38. Ishizaka, K. 1985. Twenty years with IgE: From the identification of IgE to regulatory factors for the IgE response. J. Immunol. 135:I-X.
39. James, G.T. 1978. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. Anal. Biochem. 86:574-579.
40. Kagnoff, M.F. 1977. Functional characteristics of Peyer's patch lymphoid cells. IV. Effect of antigen feeding on the frequency of antigen-specific B cells. J. Immunol. 118:992-997.
41. Kiyono, H., J.L. Babb, S.M. Michalek, and J.R. McGhee. 1980. Cellular basis for elevated IgA responses in C3H/HeJ mice. J. Immunol. 125:732-737.
42. Maschefsky, J. 1981. Die immungene Wirkung von Staphylokokken-Enterotoxin B nach Vernetzung bei aerogener und parenteraler Verabreichung an Kaninchen. Vet. Med. Diss. München.
43. Mattingly, J.A., and B.H. Waksman. 1978. Immunologic suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. J. Immunol. 121:1878-1883.
44. Mattsby-Baltzer, I., and B. Kaijser. 1979. Lipid A and anti-lipid A. Infect. Immun. 23:758-763.

45. McDermott, M.R., and J. Bienenstock. 1979. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J. Immunol.* 122:1892-1898.
46. McDermott, M.R., D.A. Clark, and J. Bienenstock. 1980. Evidence for a common mucosal immunologic system. II. Influence of estrous cycle on B immunoblast migration into genital and intestinal tissues. *J. Immunol.* 124:2536-2539.
47. McGann, V.G., J.B. Rollins, and D.W. Mason. 1971. Evaluation of resistance to staphylococcal enterotoxin B: Naturally acquired antibodies of man and monkey. *J. Infect. Dis.* 124:206-213.
48. Michalek, S.M., H. Kiyono, M.J. Wannemuehler, L.M. Mosteller, and J.R. McGhee. 1982. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS influence on oral tolerance induction. *J. Immunol.* 128:1992-1998.
49. Mizoguchi, K., I. Nakashima, Y. Hasegawa, K. Isobe, F. Nagase, K. Kawashima, K. Shimokata, and N. Kato. 1986. Augmentation of antibody responses of mice to inhaled protein antigens by simultaneously inhaled bacterial lipopolysaccharides. *Immunobiol.* 173:63-71.
50. Möller, G. (ed.). 1978. Immunoglobulin E. *Immunol. Rev.* Vol. 41.
51. Montgomery, P.C., K.M. Connelly, J. Cohn, and C.A. Skandera. 1978. Remote-site stimulation of secretory IgA antibodies following bronchial and gastric stimulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 107:113-122.

52. Mowat, A.McI., M.J. Thomas, S. MacKenzie, and D.M.V. Parrott. 1986. Divergent effects of bacterial lipopolysaccharide on immunity to orally administered protein and particulate antigens in mice. *Immunology* 58:677-683.
53. Nakano, M., T. Shimamura, and K. Saito. 1971. Adjuvancy of endotoxin from heptoseless *Salmonella* mutants. *Japan. J. Microbiol.* 15:102-104.
54. Nakano, M., M.J. Tanabe, T. Saito, and T. Shimizu. 1976. Immunosuppressive effect of bacterial lipopolysaccharide on antibody response. *Japan. J. Microbiol.* 20:53-58.
55. Ngan, J., and L.S. Kind. 1978. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J.Immunol.*120:861-865.
56. Pierce, N.F., and H.Y. Reynolds. 1974. Immunity to experimental cholera. I. Protective effect of humoral IgG antitoxin demonstrated by passive immunization. *J. Immunol.* 113:1017-1023.
57. Pierce, N.F., and J.L. Gowans. 1975. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J. Exp. Med.* 142:1550-1563.
58. Pinto, M., M. Torten, and S.C. Birnbaum. 1978. Suppression of the in vivo humoral and cellular immune response by staphylococcal enterotoxin B(SEB). *Transplantation* 25:320-323.

59. Richman, L.K., A.S. Graeff, R. Yarchoan, and W. Strober. 1981. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J. Immunol.* 126: 2079-2083.
60. Roitt, I.M. 1984. *Essential immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
61. Rudzik, R., R.L. Clancy, D.Y.E. Perey, R.P. Day, and J. Bienenstock. 1975. Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes. *J. Immunol.* 114:1599-1604.
62. Scheuber, H.P., J.R. Golecki, B. Kickhöfen, D. Scheel, G. Beck, and D.K. Hammer. 1985. Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: A new approach for investigating the site of toxin action. *Infect. Immun.* 50:869-876.
63. Scheuber, H.P., C. Denzlinger, D. Wilker, G. Beck, D. Keppler, and D.K. Hammer. 1986. The role of endogenous cysteinyl leukotrienes in the action of staphylococcal enterotoxin B in the monkey. (Submitted for publication).
64. Schmidt, J.J., and L. Spero. 1983. The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C₁. *J. Biol. Chem.* 258:6300-6306.
65. Sedgwick, J.D., and P.G. Holt. 1985. Induction of IgE-secreting cells and IgE isotype-specific suppressor T cells in the respiratory lymph nodes of rats in response to antigen inhalation. *Cell. Immunol.* 94:182-194.

66. Sedgwick, J.D., and P.G. Holt. 1986. Induction of IgE-secreting cells in the lymphatic drainage of the lungs of rats following passive antigen inhalation. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 79:329-331.
67. Silverman, S.J., D.A. Espeseth, and E.J. Schantz. 1969. Effect of formaldehyde on the immunochemical and biological activity of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 98:437-442.
68. Silverman, S.J., G.T. Moore, and W.G. Roessler. 1969. Effect of formaldehyde on the immunogenicity of staphylococcal enterotoxin B for *Macaca mulatta*. *J. Bacteriol.* 98:443-446.
69. Sjöberg, O., J. Andersson, and G. Möller. 1972. Lipopolysaccharide can substitute for helper cells in the antibody response in vitro. *Eur. J. Immunol.* 2:326-331.
70. Spero, L., H.M. Jacoby, J.E. Dalidowicz, and S.J. Silverman. 1971. Guanidination and nitroguanidination of staphylococcal enterotoxin B. *Biochim. Biophys. Acta* 251:345-356.
71. Spero, L., and B.A. Morlock. 1978. Biological activities of the peptides of staphylococcal enterotoxin C formed by limited tryptic hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 253:8787-8791.
72. Spero, L., and B.A. Morlock. 1979. Cross-reactions between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxins B and C₁. *J. Immunol.* 122:1285-1289.

73. Steinhardt, I. 1982. Einfluß von Staphylokokken-Enterotoxinen auf immunologische Vorgänge - Eine Literaturstudie - Vet. Med. Diss., München.
74. Stelma, G.N., and M.S. Bergdoll. 1982. Inactivation of staphylococcal enterotoxin A by chemical modification. Biochem. Biophys. Res. Comm. 105:121-126.
75. Sugiyama, H., E.M. McKissic, M.S. Bergdoll, and B. Heller 1964. Enhancement of bacterial endotoxin lethality by staphylococcal enterotoxin. J. Infect. Dis. 114:111-118.
76. Suko, M., T. Ogita, H. Okudaira, and Y. Horiuchi. 1977. Preferential enhancement of IgE antibody formation by Bordetella pertussis. Int. Archs Allergy appl. Immun. 54: 329-337.
77. Suzuki, I., H. Kiyono, K. Kitamura, D.R. Green, and J.R. McGhee. 1986. Abrogation of oral tolerance by contrasuppressor T cells suggests the presence of regulatory T-cell networks in the mucosal immune system. Nature 320: 451-454.
78. Titus, R.G., and J.M. Chiller. 1981. Orally induced tolerance. Definition at the cellular level. Int. Archs Allergy appl. Immun. 65:323-338.
79. Tomasi, T.B., and J. Bienenstock. 1968. Secretory immunoglobulins, p.1-96. In: F.J. Dixon, and H.G. Kunkel (ed.), Advances in immunology, vol. 9. Academic Press, New York.
80. Tomasi, T.B. 1980. Oral tolerance. Transplantation 29: 353-356.

81. Uchiyama, T., and D.M. Jacobs. 1978. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS): Multifocal effects of LPS-induced suppression of the primary antibody response to a T-dependent antigen. *J. Immunol.* 121:2340-2346.
82. Unanue, E.R. 1978. The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. *Immunol. Rev.* 40:227-255.
83. Wallace, J.M., A. Catanzaro, S. Batcher, and J.L. Abraham. 1983. A guinea pig model to study effects of persistent intrabronchial antigenic stimulation and inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128:1077-1083.
84. Wannemuehler, M.J., H. Kiyono, J.L. Babb, S.M. Michalek, and J.R. McGhee. 1982. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J. Immunol.* 129:959-965.
85. Warren, J.R., L. Spero, and J.F. Metzger. 1973. Antigenicity of formaldehyde-inactivated staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol.* 111:885-892.
86. Warren, J.R., L. Spero, J.F. Metzger, and V.G. McGann. 1975. Immunogenicity of formaldehyde-inactivated enterotoxins A and C₁ of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 131:535-542.
87. Watanabe, N., and Z. Ovary. 1977. Antigen and antibody detection by in vivo methods: A reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reactions. *J. Immunol. Meth.* 14: 381-390.

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas, die Unterstützung der Arbeit und den großzügigerweise zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. D.K. Hammer, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Brsg., unter dessen Anleitung die Arbeit durchgeführt wurde, für die jederzeit gewährten Ratschläge, seine Bereitschaft zur kritischen Diskussion der Forschungsergebnisse und die durch ihn erfahrene Motivation zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Dr. H.P. Scheuber danke ich ebenfalls für seine Bereitschaft zum fachlichen Gespräch und ihm und seinen Mitarbeitern für Bereitstellung und Betreuung der Versuchstiere.

Herrn Dr. C. Galanos, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Brsg., danke ich für das zur Verfügung gestellte Lipopolysaccharid.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, danke ich an dieser Stelle ebenfalls, insbesondere Frau Ursula Zerschausky für ihre technische Assistenz.

Lebenslauf

Geburtsdatum	29. Januar 1954
Geburtsort	Lauingen/Donau
Eltern	Rudolf Friedrich und Hildegard Friedrich, geb. Hochmuth
1960 - 1965	Volksschule Lauingen/Donau
1965 - 1974	Albertus-Gymnasium Lauingen/Donau
Mai 1974	Reifezeugnis
1974 - 1981	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juni 1981	Approbation als Tierarzt
seit September 1981	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München

